GE Healthcare

Biacore

Biacore 1000

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

GE imagination at work

JJ-3003-02
(71-3200-31)

Biacore 1000 コントロールソフトウエア

日本語マニュアル

GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
TEL:03-5331-9336
FAX:03-5331-9370
E-mail:Tech-JP@ge.com

目 次

１．セットアップ 1
1-1 電源およびソフトウェアの起動 1
1)電源の立ち上げおよび緩衝液の準備 1
2)Biacore コントロールソフトウェアの起動 2
1-2 システムの初期化 3
1)Dock（センサーチップの挿入） 3
2)Prime 5
3)ラックベースの設定 7
4)温度設定 9
5)Normalize 10

２．基本操作 11
2-1 サンプルのインジェクト 11
2-2 レポートポイントの取り方 14
2-3 ファイルの保存 17

３.リガンドの固定化 18
3-1 アミンカップリング 19
3-2 プレコンセントレーションの検討（マニュアル操作） 21
3-3 プログラム操作によるリガンドの固定化 24
1)ファイルの呼び出し 24
2)Method の編集 28
3)エラーの検索 29
4)プログラムの実行 30
5)プログラムの終了 32
3-4 MANUAL　INJECT を用いた固定化量の調節方法 35

４．相互作用の検討 40
4-1 マニュアル操作による相互作用の検討 42
4-2 プログラムによる相互作用の検討 49
1)ファイルの呼び出し 49
2)Method の編集 51
3)エラーの検索 51
4)プログラムの実行 51
5)プログラムの終了 51
4-3 ファイルの保存様式 52

５．シャットダウン 53
5-1 実験の終了 53
5-2 センサーチップの抜き取り（Undock） 54

5-3 センサーチップの保存 54
６．メンテナンス 55
6-1 メンテナンス 55
6-2 エアーの除去 56
6-3 流路系に詰まりがあるとき 57
6-4 システムチェック 58

７．データ管理 61
１)Explore から作成する方法 61
２)My Computer から作成する方法 61

８．プログラムの説明 62
ステップ１） MAIN ボックス 62
ステップ２） APROG ボックス 63
ステップ３） レポートポイント 66
ステップ４） 固定化のプログラム 69
ステップ５） 相互作用のプログラム 72

1.セットアップ

1-1. 電源およびソフトウェアの起動

1)電源の立ち上げおよび緩衝液の準備

定電圧電源装置 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピューター の順番に電源を入れる。

↓

本体のフロントパネル上の左にあるインジケータ（ライト）が点灯し、30 秒程でリセット後、新たに必要事項のみが点灯あるいは点滅する。

↓

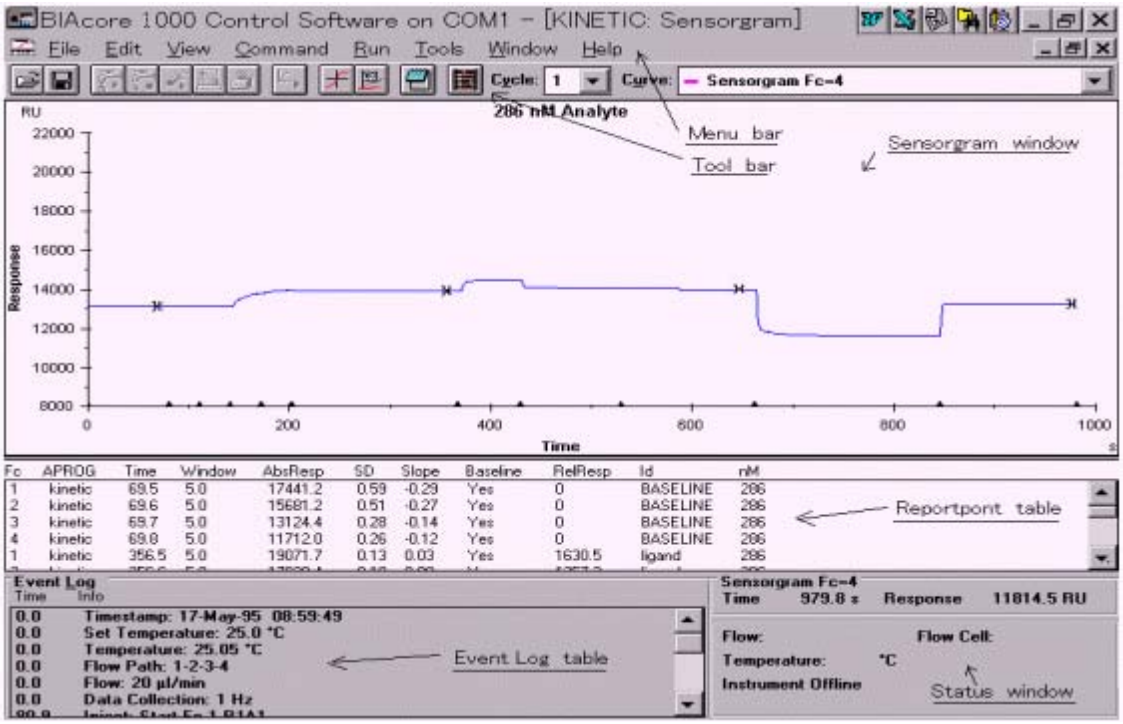
Biacore 本体のドアを開け、本体右側下部の細い 2 本のインレットチューブをランニング緩衝液のボトルに入れ、太いシリコンチューブを廃液入れの空ボトルに入れる。

装置の配置

2)Biacore コントロールソフトウェアの起動

モニター初期画面中の左下の**スタート**を押し、**BIA Programs** をクリックし、

BIACORE 1000 Control Software をクリックする。



画面の説明

Menu bar

BIACORE の全ての操作コマンドが含まれている。

Toolbar

使用頻度の高いコマンドをアイコン化しており、簡便にコマンド操作を選択できる。

Sensorgram window

センサーグラムをリアルタイムに表示。

Report point table

指定した時間におけるレスポンスを数値で表示。固定化量や結合量の表示等に使用。

Eventlog window

測定中の操作内容を表示。グラフの X 軸上の（▼）と対応。

Status window

現在のシステムの状態を表示。

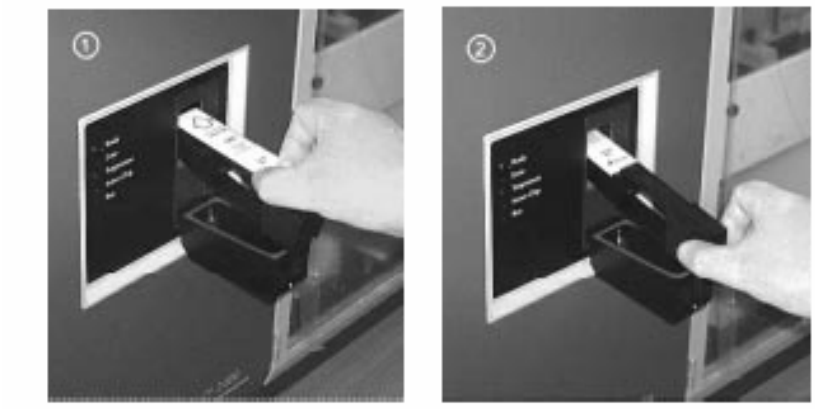
時間、レスポンス（RU）、流速、使用フローセル、温度、Run 実行状態

1-2. システムの初期化

1）Dock（センサーチップの挿入）

ソフトウェアを立ち上げると**Dockボックス**が自動的に表示される。

↓



黒いカバーを開け、コンベアを手前に引く。コンベアによって引かれてきたガイドピンにセンサーチップシートのホールが入るようにセンサーチップをセットし、コンベアを押し込み、カバーを戻す。
（フロントパネルの Sensor chip のインジケータが緑色に点滅する）

↓

Dock ボックスの**Dock** をクリックする。
（フロントパネルの Sensor chip のインジケータが緑色の点灯に変わる）

Dock 操作における注意事項・解説

① センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入する。

② センサーチップの交換は必ず Undock の状態で行う。**インジケータの Sensor chip が Dock 状態（緑色の点灯時）で、強引にセンサーチップを抜かないこと。**

③ センサーチップを冷蔵庫から取り出した場合には、室温に戻した後、包装あるいは容器から取り出すようにする。

センサーチップの種類

(1) **CM5**：カルボキシメチルデキストランをコーティングしたチップ。アミンカップリング、チオールカップリング、アルデヒドカップリング等の固定化に利用する汎用性の高いチップ。

Research Grade:ロット間の誤差が 15%以下のチップ。通常の実験に使用できる。

Certified Grade:ロット間の誤差が 5%以下のチップ。品質管理等で長期に渡る精密な実験を組む場合等に使用する。

(2) **CM4**: CM5 のカルボキシメチルデキストラの導入量を減少させたチップ。カルボキシル基にイオン交換的に非特異的結合する塩基性物質を含むサンプルを用いる場合に使用。

(3) **CM3**：CM5 のカルボキシルメチルデキストラを短くしたチップ。巨大分子（細胞、細菌、ファージ等）の固定化や、添加して相互作用測定をおこなう場合に利用。

(4) **C1**：金表面に直接カルボキシル基のみを導入したチップ。CM3 と同様に、巨大分子（細胞、細菌、ファージ等）を用いる場合に使用する。比較的非特異的結合が多い。

(5) **SA**：ストレプトアビジンをあらかじめ固定化してあるカルボキシルメチルデキストランベースのチップ。ビオチン化した DNA、ペプチド、化合物等ビオチン化分子の固定化に使用。

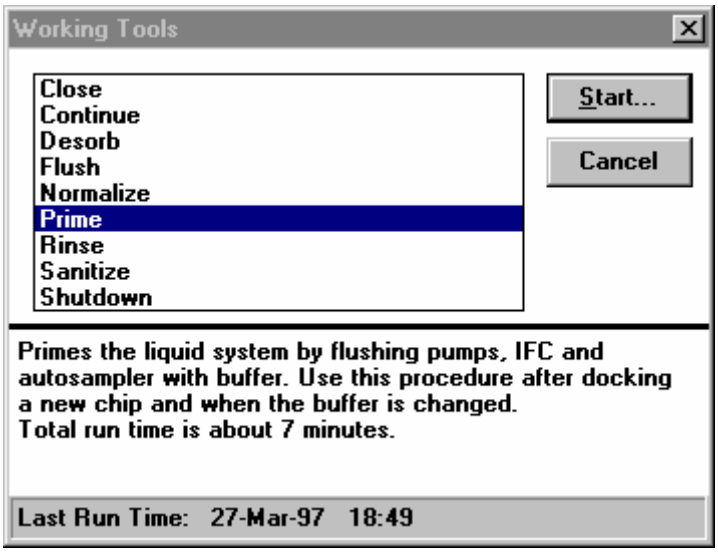
(6) **NTA**: NTAをあらかじめ固定化してあるカルボキシルメチルデキストランベースのチップ。ヒスチジンタグを持つ発現タンパク質（His-Tag Fusion Protein）をNi^{2+}を介して固定化できる。

(7) **HPA**：金表面にオクタデシル基（C18）を導入したチップ。疎水性の高い表面で、リン脂質や糖脂質などをリポソームとして添加することで、単層（Monolayer）で固定化できる。

(8) **L1**：疎水性分子をあらかじめ固定化してあるカルボキシルメチルデキストランベースのチップ。リン脂質や糖脂質などをリポソームとして添加することで、2 重膜（Bilayer）で固定化できる。糖脂質、リン脂質や膜貫通型レセプター等の固定化に使用できる。

2）Prime（システムの初期化）

Dock操作終了後、自動的にWorking Toolsの**Prime**が選択される。



緩衝液および廃液入れを確認後、**Start...**をクリックする。

↓

内容確認のボックスが出るので確認後、**Start**をクリックする。

↓

Primeが終了すると終了確認のボックスが出るので、**Exit**をクリックする。

Prime における注意事項・解説

① Prime は、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄、置換する操作である。新しくセンサーチップをセットした時や、実験途中にランニング緩衝液を交換した場合に必ず行う。

② このボックスは、**Tools → Working Tools** の中で選択できる。
実験途中でランニング緩衝液を交換する場合には、**Working Tools**を開いて**Prime** を行う。

ランニング緩衝液について

ランニング緩衝液として、弊社から 3 種類の HBS 緩衝液を発売している。**フィルターろ過、脱気済みである。**

HBS-EP:
10 mM HEPES /0.15 M NaCl /3 mM EDTA /0.005% Surfactant P20（pH7.4）

HBS-P:
10 mM HEPES /0.15 M NaCl /0.005% Surfactant P20（pH7.4）

HBS-N:
10 mM HEPES /0.15 M NaCl（pH7.4）

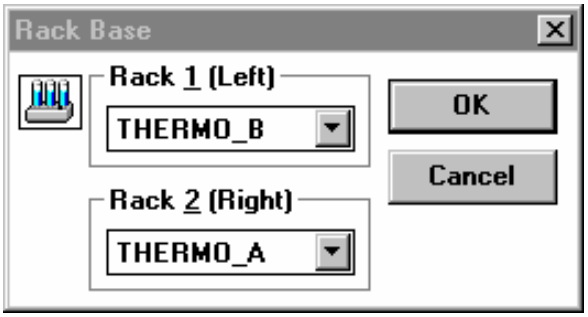
実験目的にあわせ、緩衝液の変更は自由である。**各自で調製した場合には、0.22 µm フィルターでろ過を行い、実験前に十分脱気を行う。**
なお、CM5 センサーチップを使用してアミンカップリングを行う場合は、固定化終了時までアミン系の緩衝液(トリスあるいはグリシン緩衝液等)は使用しない。

3）ラックベースの設定

Biacore 本体にセットしてあるラックベースの設定を行う。

Command → Rack Base...をクリックする。

↓



ラックベースは向かって左側が Rack Base1、右側が Rack Base2 となる。

各ラックの前面にある名称を確認し、変更がある場合には、 をクリックしラックを選択する。

↓

ラック設定後 **OK** をクリックする。

誤った設定により、ニードル破損の危険があるので注意する。

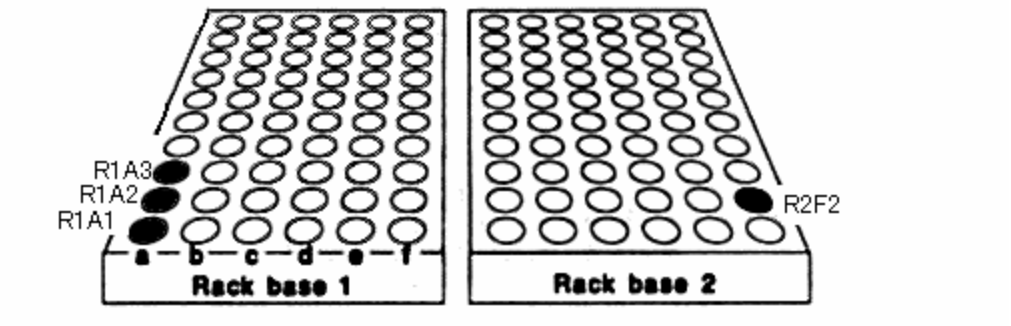
各ラックと使用できるバイヤルについては、8 ページを参照。

ラックベース設定における注意事項・解説

ラックは Thermo_A、Thermo_B、Thermo_C の 3 種類がある。また、ラックの代わりに 96 穴のマイクロタイタープレートがセットできる。
各ラックには次のバイヤルがセットできる。

Thermo_A	7 mm プラスチックバイヤル
	9 mm ガラスバイヤル
	0.5 ml 容エッペンチューブ
	16 mm ガラスバイヤル
Thermo_B	9 mm のガラスバイヤル
	0.5 ml 容エッペンチューブ
Thermo_C	2 ml プラスチックバイヤル
	1.5 ml 容エッペンチューブ
MICRO	96 穴のマイクロタイタープレート

ラックのサンプルの位置は以下のように指定される。



ラックベースは向かって左側が Rack Base1（R1）、右側が Rack Base2（R2）となる。たとえば、左側のラックの “a” の列の手前の 1 番目から 3 番目のサンプル（黒く塗りつぶした位置）は、それぞれ“R1A1、R1A2、R2A3”となる。また、右側のラックの “f” の列の 2 番目のサンプル（黒く塗りつぶした位置）は、“R2F2”となる。マイクロタイタープレート（96 穴）の場合にも同様の方法で指定する。

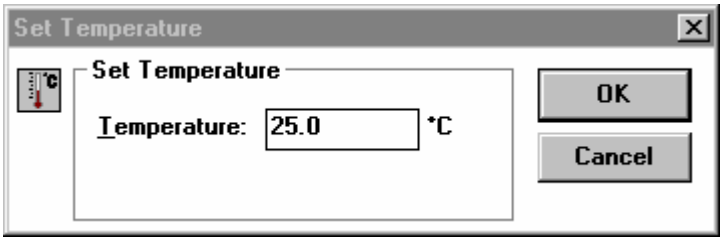
Biacore 社純正以外のバイヤルを使用する場合の注意事項

① バイヤルの底がラックの穴の底に届くものを使用する。
② ニードルはラックの穴の中央に下りるため、バイヤルのエッジがぶつからないものを使用する。
③ 蓋付のバイヤルは、蓋を取るかニードルがぶつからないように注意する。
④ バイヤルの高さは 5cm 以下のものを使用する。

4)温度設定（フローセルを含む検出器部位の温度設定）

Command → **Set T**emperature...をクリックする。

↓



20～37℃の範囲で設定し、**OK** をクリックする。

温度設定における注意事項・解説

① 温度設定は 20～37℃で設定できる。

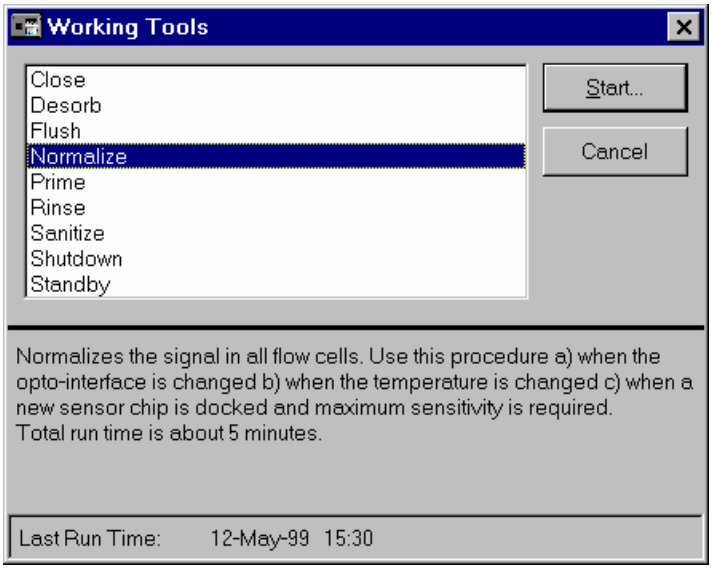
② 設定温度に達していない状態では、画面上の states window 中の温度の表示が赤字の点滅、本体の Temperature のインジケータが橙色の点滅である。設定温度に達し温度が安定した状態では、画面上の温度の表示が黒字に、インジケータは点灯に変わる。

③ 温度が安定するまでに比較的時間がかかるので、設定温度が室温から離れている場合は、早めに設定する。

④ サンプルラックの温度を調整したい場合には、恒温循環槽のチューブを本体右側面のノズルに接続する。この時、専用のアダプターを使用する。

5)Normalize（SPRシグナルの校正）

BIAmaintenance kit中の**BIAnormalizing solution 0.5 ml**を**R2F2** にセットし、**Tools** → **Working Tools...** → **Normalize** をクリックする。


Working Tools
Close
Desorb
Flush
Normalize
Prime
Rinse
Sanitize
Shutdown
Standby
Start...
Cancel
Normalizes the signal in all flow cells. Use this procedure a) when the opto-interface is changed b) when the temperature is changed c) when a new sensor chip is docked and maximum sensitivity is required.
Total run time is about 5 minutes.
Last Run Time: 12-May-99 15:30

画面上のガイダンスに従って溶液をセット後、**Start...**をクリックする。

Normalize における注意事項・解説

以下の場合に実行する。

① 設定温度を変更した場合。
② 最大感度を得たい場合。（低分子化合物を測定する場合など）
③ センサーチップの種類を変えた場合。

必ず、温度が安定した状態で行う。

センサーチップは固定化済みのものでもよい。

2.基本操作

サンプルのインジェクト等、基本操作の解説をする。

Biacore はセンサーチップ表面近傍の質量変化を測定しているため、ランニング緩衝液と密度が異なる溶液がフローセルを通過するとレスポンスとして検出される。

ここでは、センサーチップ表面と相互作用を示さない各濃度の Sucrose 溶液を使用して基本操作および SPR シグナルについて説明する。

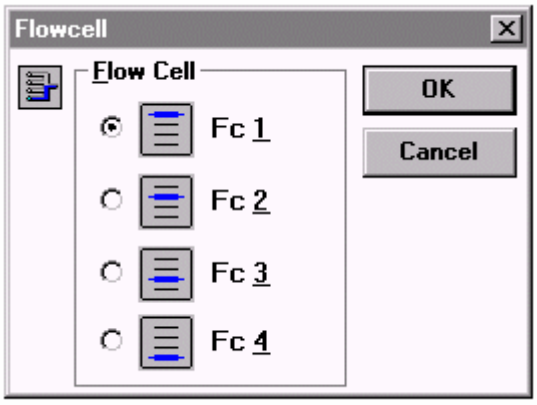
（サンプル）

2% Sucrose
4% Sucrose
8% Sucrose
16% Sucrose

2-1. サンプルのインジェクト

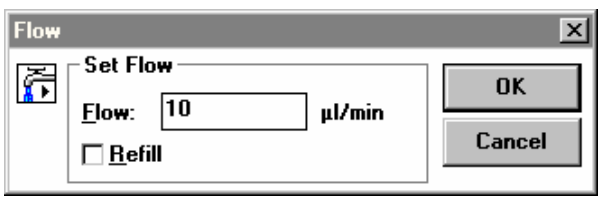
サンプル（100µl）をそれぞれラックにセットする。

アイコン（ ）あるいは**Run → Run sensorgram...**をクリックし、センサーグラムをスタートする。



Flow Cellを選択後、**OK**をクリックする。

↓



流速（1～100µl/min）を入力後、**OK** をクリックする。

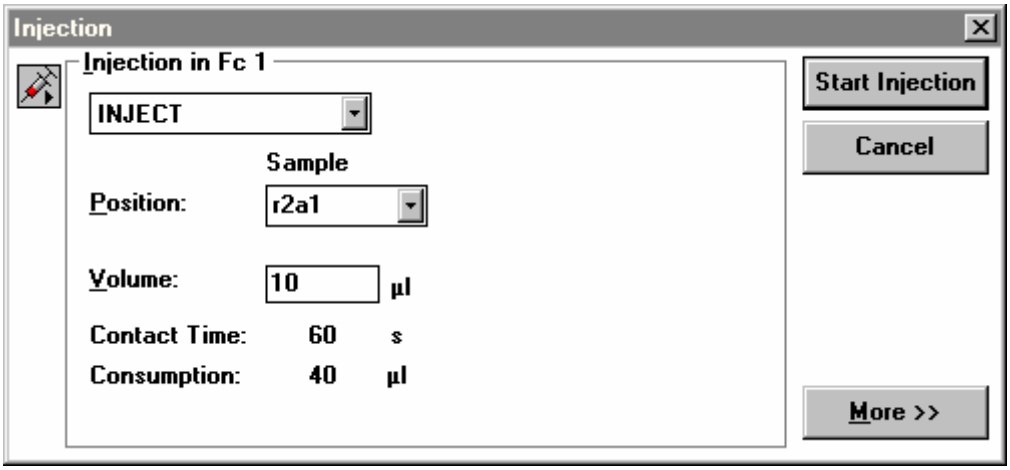
↓

（センサーグラムが表示され測定が開始される）

↓

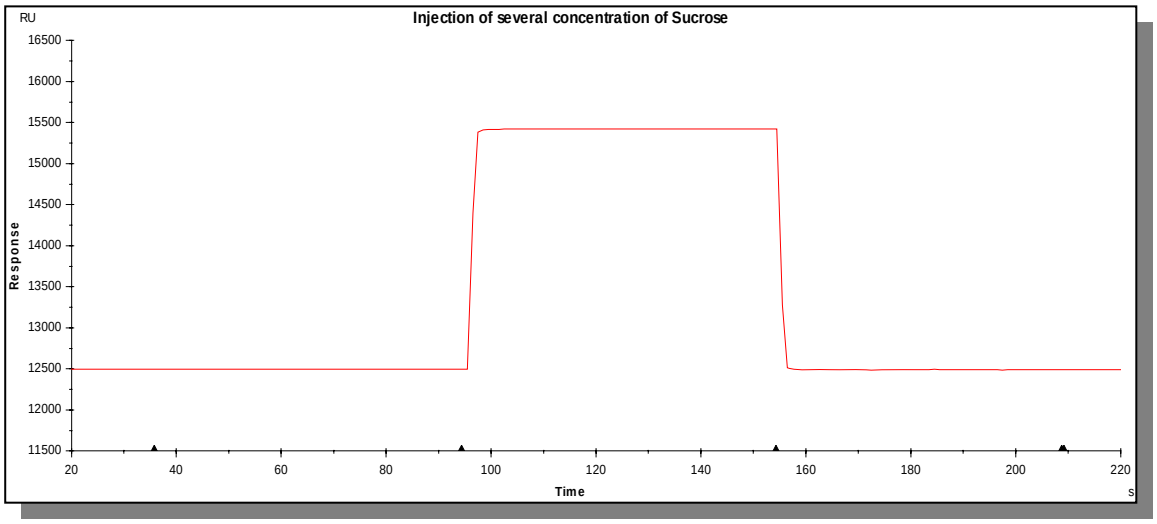
アイコン（ ）あるいは**Command → Inject...**をクリックする。

↓



サンプルのポジションおよび添加容量（10µl 程度）を入力し、
Start Injection をクリックする。

↓

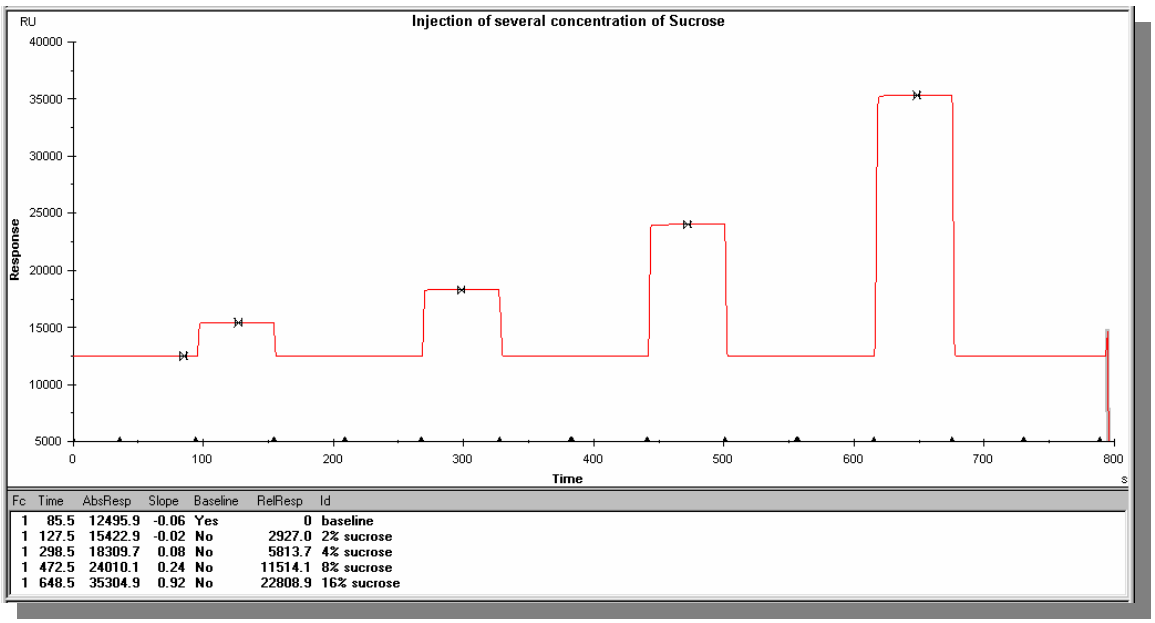


2% Sucrose のインジェクション

↓

引き続き同様の手順でサンプルをインジェクトする。

↓



全てのサンプルのインジェクションが終了したら、アイコン（ ）もしくは **Run** → **Stop Sensorgram**をクリックし、測定を終了する。

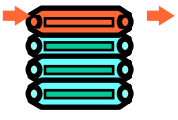
マニュアル操作における注意事項

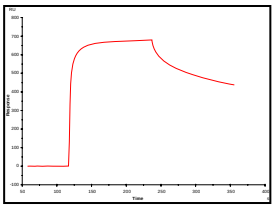
フローセルは全部で４個ある。

また、それぞれのフローセルから得られるセンサーグラムは、色が決まっている。

各フローセルでのセンサーグラムの色

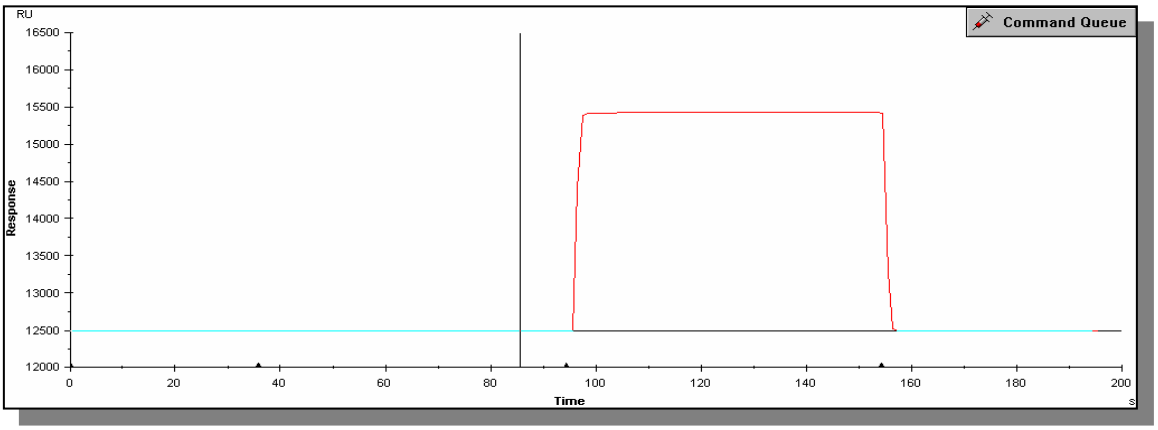
フローセル　1　赤
フローセル　2　緑
フローセル　3　青
フローセル　4　ピンク





2-2.　レポートポイントの取り方

レポートポイントは、センサーグラム上の任意の時間におけるレスポンス（RU）をセンサーグラムウインドウの下のレポートポイントテーブルに表示させる操作である。



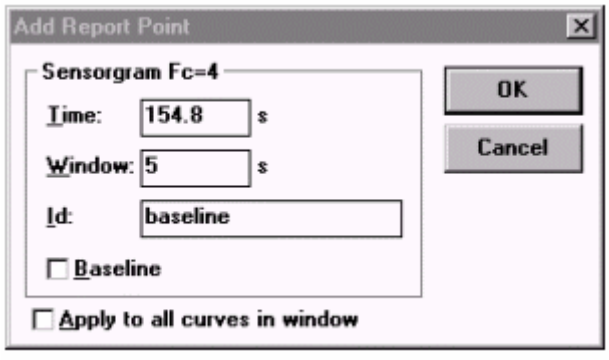
アイコン（ ）あるいは**View → Reference Line**をクリックし、グラフ中にリファレンスラインを表示させる。

↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線上に移動後、マウスの左ボタンをドラックし、リファレンスラインの縦軸と横軸の交点を、レポートポイントを取りたい位置に移動する。または、レポートポイントを取りたいセンサーグラム上の位置で左ボタンをクリックし、リファレンスラインを移動する。

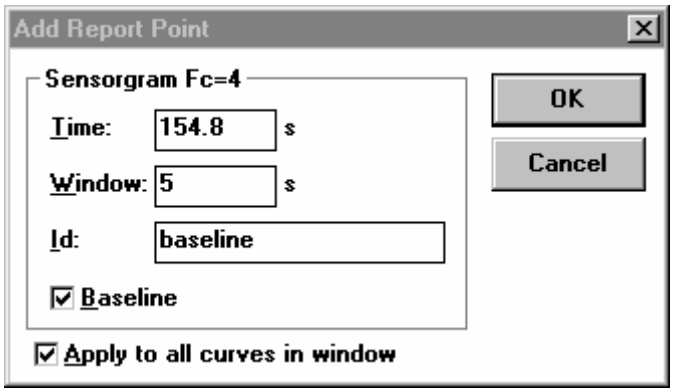
↓

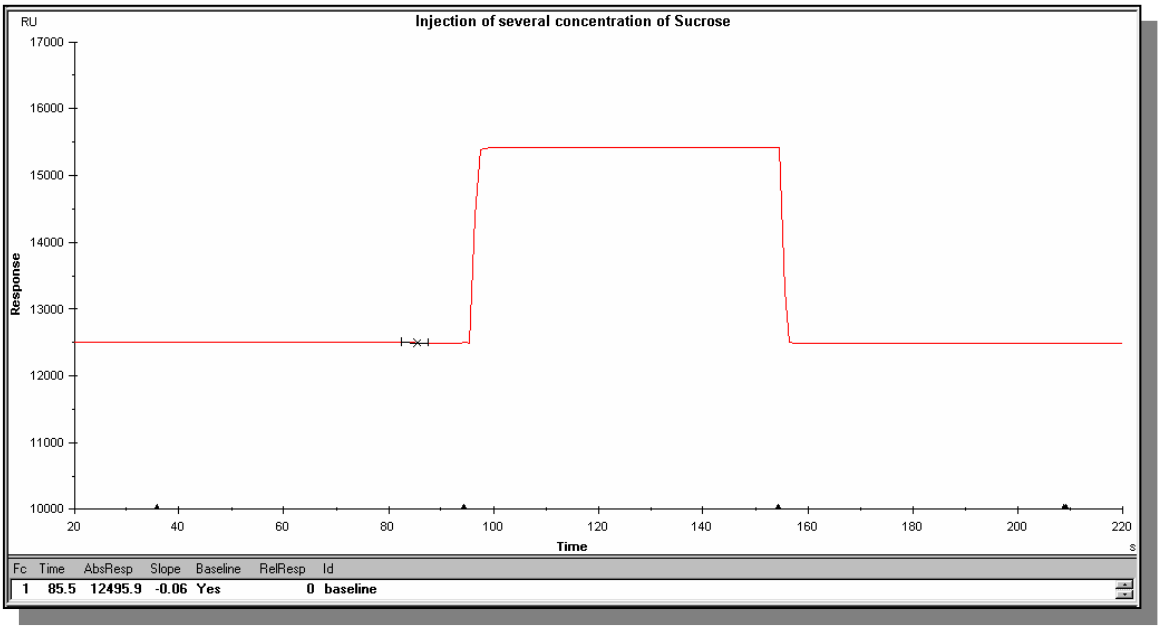
アイコン（ ）あるいは**Edit → Add Report Point**をクリックする。



↓

Idの欄にコメントを入力する。ベースライン（相対値 0）とする場合には、**Baseline** の□をクリックすると、表中の相対値（RelResp）の値が 0 になる。



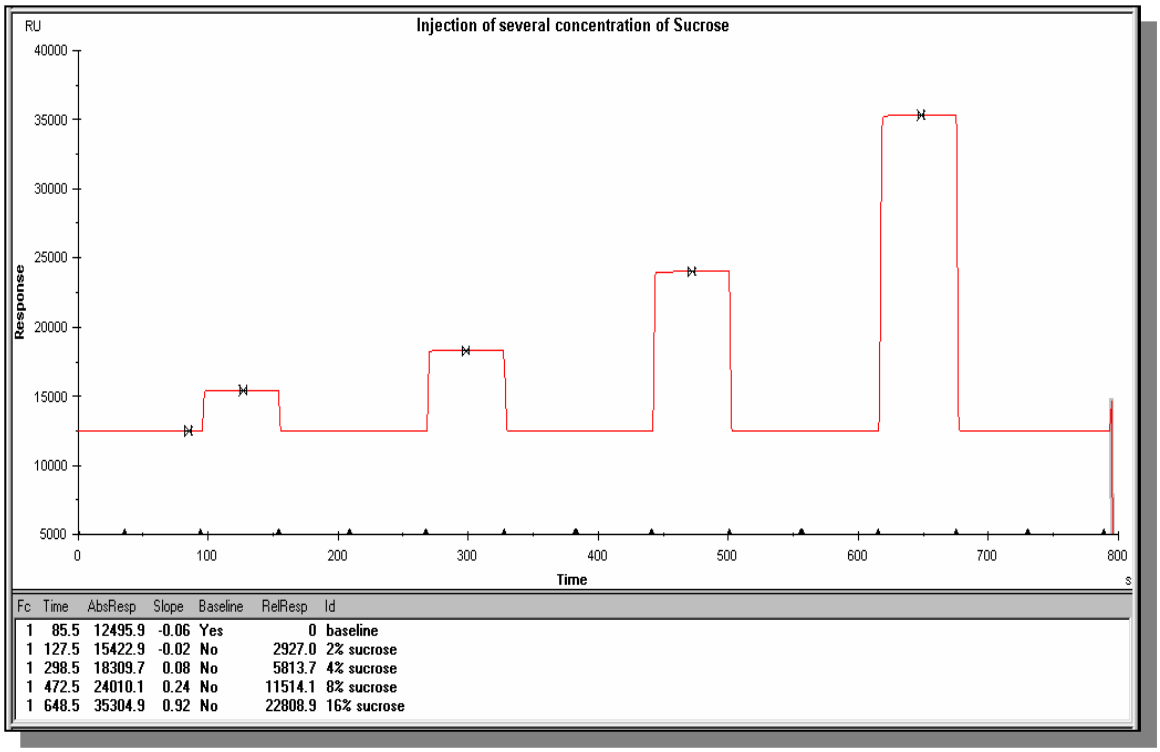


↓

リファレンスラインを他のポイントに移動後、同様にレポートポイントをとる。RelResp の欄にベースラインからの相対値が表示される。

さらに必要な場所のレポートポイントを作成する。

↓



Fc	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id
1	85.5	12495.9	-0.06	Yes	0	baseline
1	127.5	15422.9	-0.02	No	2927.0	2% sucrose
1	298.5	18309.7	0.08	No	5813.7	4% sucrose
1	472.5	24010.1	0.24	No	11514.1	8% sucrose
1	648.5	35304.9	0.92	No	22808.9	16% sucrose

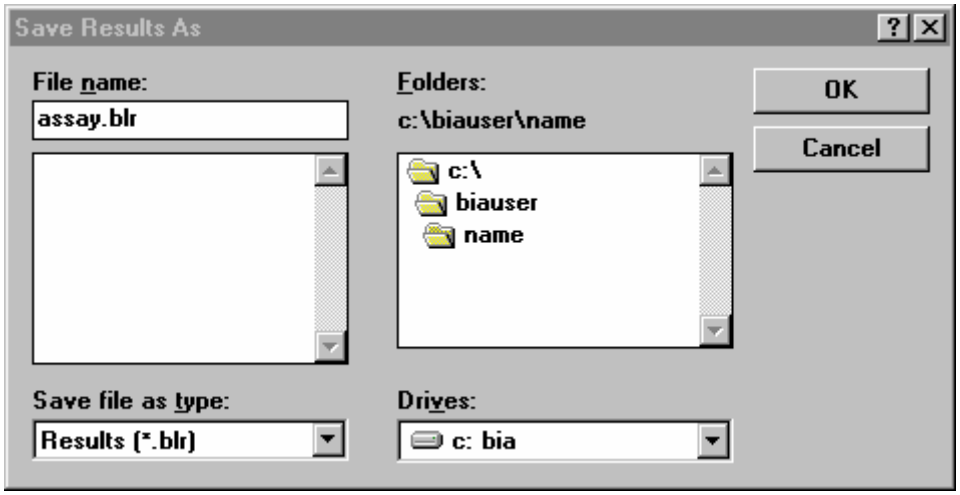
各溶液の密度に依存したレスポンスが得られる。
このような溶液の密度に依存したレスポンスを、Biacore では**溶液効果（Bulk effect）**と呼ぶ。ランニング緩衝液に比べ軽い溶液の場合には負のレスポンスに、重い溶液の場合には正のレスポンスとなる。

レポートポイントにおける注意事項・解説

① センサーグラムの下の表をレポートポイントテーブルと言う。サンプルをインジェクトする前のベースラインやインジェクト後の結合量をレスポンス量として表示することができる。
② レポートポイントの名前として “baseline” “bound”等を入力する。
③ レポートポイントは、ボックス中の Window に示された秒間隔における平均値である。この間隔は、2 秒以上で設定することが可能。
④ レポートポイントの名前等を変更、または消去する場合には、レポートポイントテーブル中の文字列をダブルクリックして入力のボックスを呼び戻す。内容の変更や、ボックス中の Delete ボタンによる消去もできる。

2-3. ファイルの保存

得られたセンサーグラムを保存するには、**File** → **Save As** を選択する。



C：＼biauser＼（個別のディレクトリー）に移動後、ファイル名を入力し、**OK** をクリックする。

ディレクトリーの作成方法については 61 ページ“データの管理”を参照。

3.リガンドの固定化

リガンド

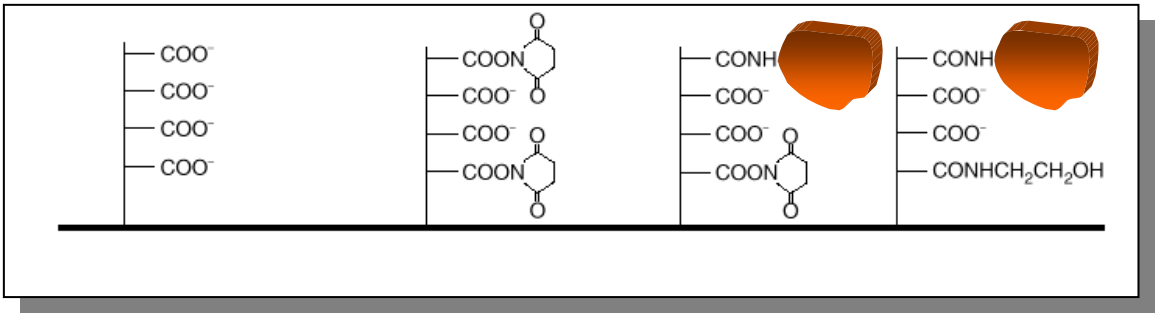
相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子を**"リガンド"**と言う。リガンドの精製度は、相互作用測定において特異性やキャパシティーに大きく影響するので非常に重要な要因となる。**90%以上の精製度のリガンドを使用する。**

リガンドの固定化方法　～CM5 を使用する場合～

① アミンカップリング

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基あるいはリジン ε-アミノ基等）を利用して固定化する方法。

CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、プレコンセントレーションを利用して濃縮したリガンドを固定化する。残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。



② チオールカップリング

リガンドチオールカップリング

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を介して固定化する方法。

サーフェスチオールカップリング

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して固定化する方法。リガンドの修飾操作などが必要である。

③ アルデヒドカップリング

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の固定化をする方法。糖鎖の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により解裂させアルデヒド基を作成し、ヒドラジンによりアミノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化する方法。（リガンドの修飾操作などが必要である。）

リガンドの固定化方法　～SA を使用する場合～

DNA の固定化

DNA（プライマー等）を固定する場合、末端ビオチン標識した DNA を適当な緩衝液に希釈(終濃度で 1～10μg/ml)し、そのままインジェクトしてアビジンとビオチンの親和性によって固定化を行う。この場合には、アミン系の緩衝液を使用してもかまわない。50 ベース以上の DNA を固定化する場合には、センサー表面のカルボキシル基との荷電の影響を少なくするために、食塩を 150mM 程度添加する。

ここでは、固定化法として汎用されるアミンカップリングについて記載する。

3-1. アミンカップリング

準備するもの

① アミンカップリングキット（GE ヘルスケア バイオサイエンス社製）
② ランニング緩衝液（トリスあるいはグリシン緩衝液等の 1 級アミンを含まないもの）
③ リガンド（アジ化ナトリウム等の求核性物質の含まないもの）
④ リガンド希釈液　10mM 酢酸緩衝液(リガンドの等電点よりも 1～2 低い pH)

リガンドの等電点が不明な場合には、21 ページのプレコンセントレーション操作をおこない緩衝液の pH を決める。

1）アミンカップリングキット

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。

① EDC(N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochroride)
② NHS(N-hydroxysuccinimide)
③ 1M ethanolamine hydrochloride 溶液(pH 8.5)

（試薬の調製方法）

キットに添付されている説明書に従い、EDCおよびNHSはそれぞれ 10mlのMilliQ®水に溶解し、直ちに 200μlずつ 0.5ml 容のマイクロチューブあるいは 7mm プラスティックバイヤルにそれぞれ小分けし、蓋をして使用直前まで -20℃で冷凍保存する。使用に際して 1 組ずつの試薬を取り出し、溶解後使用する。溶解後の試薬の再凍結はできない。エタノールアミンは、溶液で供給されており 4℃で保存する。200μlずつ小分けしておくか、使用する直前にサンプリングする。

2）リガンドの調製

（タンパク質の固定化）

リガンド濃度は通常、終濃度 5～200µg/ml 程度になるよう **10mM 酢酸緩衝液**で調製する。酢酸緩衝液の pH はリガンドの等電点より 1～2 低い pH か、21 ページに示したプレコンセントレーション操作により決定した pH を用いる。また、リガンド希釈用緩衝液は非アミン系で比較的低塩濃度（10mM）のものを使用する。希釈用緩衝液は pH3.5 以下のものは使用しない。プレコンセントレーション効果が見られない場合（ペプシン等の酸性タンパク質）にはビオチン化後、SA チップに固定化する。

（ペプチドや低分子物質の固定化）

リガンドがペプチドや化合物等の低分子物質の場合は、プレコンセントレーションの効果が見られない場合がある。この場合には、弱アルカリ性条件で固定化を行う。つまり、プレコンセントレーションを行う替わりに、高濃度のリガンド溶液を使用し、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率が最もよい pH8.5 付近で固定化を行う。例えば、希釈液として、10～50mM 炭酸緩衝液（pH 8.5）を使用し、サンプル濃度を 100µg/ml 以上の比較的高濃度で固定化する方法である。リガンドの荷電の影響がある場合には、食塩を 150mM 程度添加する。しかし、この場合、必ずしも目的の固定化量が得られるとは限らない。酸性タンパクの場合は、ビオチン化後、センサーチップ SA へ固定化する方法をお勧めする。

3-2. プレコンセントレーションの検討（マニュアル操作）

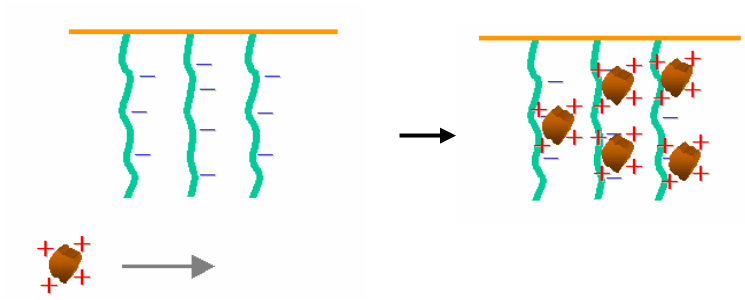
プレコンセントレーションとは？

固定化操作において、センサーチップ表面の CM デキストランに存在するカルボキシル基は非常に重要である。リガンドを正に荷電した状態でインジェクトすると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な相互作用が生じ、リガンドをデキストラン中に濃縮することができる。この方法を用いることで固定化効率を上昇させることができる。したがって、リガンドは等電点よりも低い pH の緩衝液に希釈し、リガンドを正に荷電させる必要がある。等電点が既知のサンプルの場合は、リガンドの等電点よりも 1～2 低い pH 条件を使用すればよいが、等電点が不明な場合には、**“プレコンセントレーションの検討”**を行って、固定化に適する pH を調べることができる。この操作では、**何も処理していないフローセル**を使用し、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮の程度をセンサーグラムから判断する。

（サンプル調製例）

リガンドを最終濃度で 5～50µg/ml になるよう各緩衝液で希釈する。

10mM 酢酸緩衝液（ pH6 ） 100µl
10mM 酢酸緩衝液（ pH5 ） 100µl
10mM 酢酸緩衝液（ pH4 ） 100µl



この操作によりリガンドが固定化されることはないので、プレコンセントレーションに使用したセルはそのまま固定化セルとして利用できる。通常、インジェクトが終了後、高い塩濃度のランニング緩衝液（例えば 150mM 食塩を含む HBS 緩衝液）に置換するため、静電的な作用で濃縮したリガンドは速やかに解離する。しかし、リガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすこともあるので、操作終了後、洗浄溶液（例えば 50mM NaOH、30 秒間）等で洗浄を行い、実際の固定化操作に移る。

サンプル調製

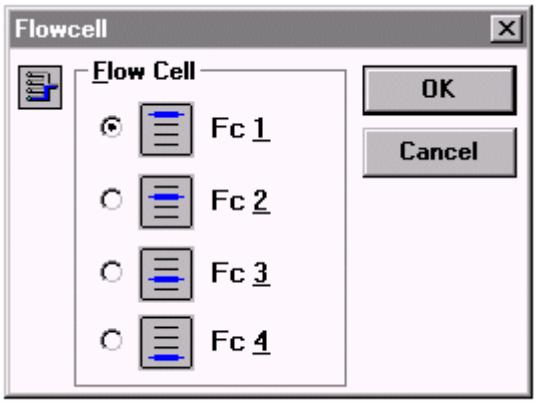
リガンドを終濃度で 5～50µg/ml になるよう各緩衝液で希釈する。

- 10mM 酢酸緩衝液（ pH6 ）　100µl
- 10mM 酢酸緩衝液（ pH5 ）　100µl
- 10mM 酢酸緩衝液（ pH4 ）　100µl

各サンプルをラックにセットする。

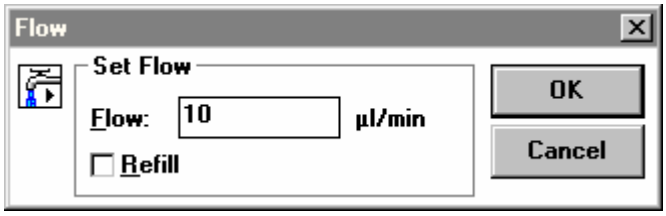
↓

アイコン（ ）あるいは **Run** → **Run Sensorgram...**をクリックし、センサーグラムをスタートする。



使用する流路（固定化を行うセル）を選択し、**OK** をクリックする。

↓



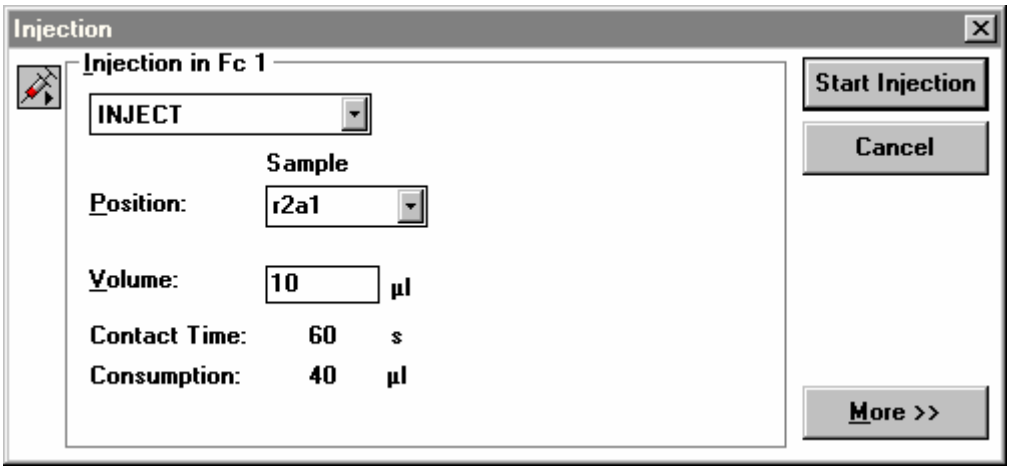
流速（1～100µl/min）を 10µl/min に設定し、**OK** をクリックする。

↓

アイコン（ ）あるいは **Command** → **Inject...**をクリックする。

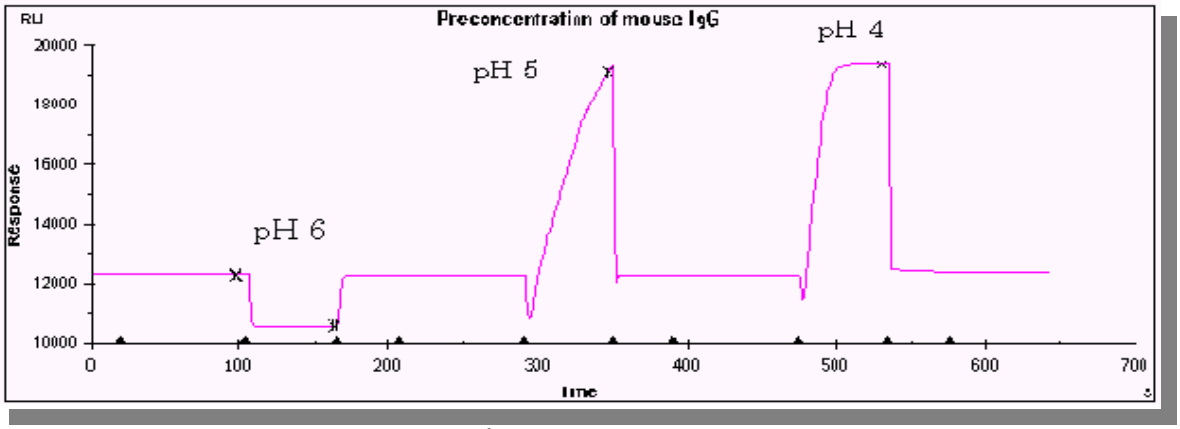
↓

サンプルの位置、容量（µl）を入力し、**Start Injection** をクリックする。



↓

引き続き、残りのサンプルも同様にインジェクトする。



Mouse IgG のプレコンセントレーション

↓

各サンプルを添加後、アイコン（ ）もしくは**Run → Stop sensorgram**をクリックし、測定を終了する。

プレコンセントレーションの評価について

プレコンセントレーション効果は、希釈緩衝液の pH を下げれば増加する。しかし、低い pH 環境下では、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は減少する。上記のセンサーグラムの場合、pH4 の方が 5 に比べ速い速度で濃縮がみられるが、必ずしも pH4 で固定化量が多くなるとは限らない。また、タンパク質の安定化のためにはできるだけ高めの pH を使用すべきである。したがって、**濃縮効果のある pH の中で、一番高い pH を使用するとよい。**上記の場合、pH5 で十分である。

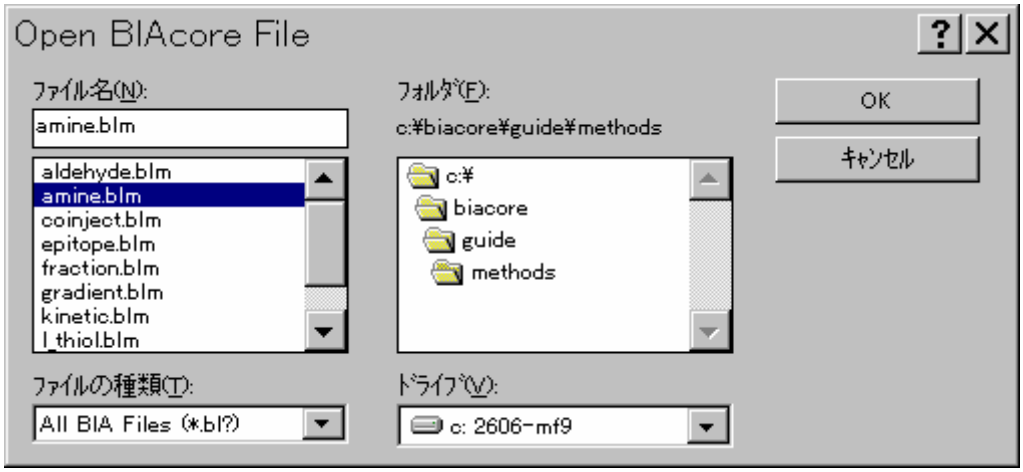
3-3. プログラム操作によるリガンド固定化

固定化は、マニュアル操作またはプログラム操作で行うことができる。ここでは、アミンカップリングを例にプログラム操作によるリガンドの固定化について記載する。
プログラムの詳細については、62 ページ～参照。

1）ファイルの呼び出し

アイコン（ ）あるいは**File** → **Open...**をクリックする。

↓



↓

C：＼biacore1000＼guide＼methods の順にディレクトリーを開け、固定化のメソッドファイルである amine.blm をクリックする。

拡張子の種類

Biacore のファイル名には、以下の拡張子が付く。

ファイル名 .**blm**　：Method ファイル
ファイル名 .**blr**　：Result ファイル
ファイル名 .**ble**　：BIAevaluation software で作成したファイル

拡張子からファイルの種類を確認できる。

以下のプログラムが表示される。

（固定化プログラム）

```
DEFINE APROG immob
CAPTION Amine coupling                    ! グラフのタイトル
        FLOW        10                    ! 流速 10µl/min
        DILUTE      R2E1 R2E2 R2E3 50     ! NHS/EDC の混合液の作成
   *    INJECT      R2E3 70               ! NHS/EDC の混合液の添加
-0:10   RPOINT      Baseline –b           ! レポートポイントの表示
        INJECT      R2A1 70               ! リガンド溶液の添加
   *    INJECT      R2E4 70               ! エタノールアミンの添加
   *    INJECT      R2F3 10               ! 洗浄溶液の添加
2:00    RPOINT      immob                 ! レポートポイントの表示
END

MAIN
        RACK 1      thermo_b              ! ラックベースの設定
        RACK 2      thermo_a              ! ラックベースの設定
        FLOWCELL    1                     ! 検出フローセルの設定
        APROG       immob                 ! APROG immob の実行
        APPEND      CONTINUE              ! CONTINUE の実行
END
```

（試薬およびサンプルの位置）

R2A1 ： リガンド（至適 pH の酢酸緩衝液に希釈したもの）
R2E1 ： NHS（もしくは EDC、冷凍庫から取り出し溶解直後のもの）
R2E2 ： EDC（もしくは NHS、冷凍庫から取り出し溶解直後のもの）
R2E3 ： 空容器（9 mm ガラスバイヤルあるいは 0.5ml マイクロチューブ）
R2E4 ： エタノールアミン 溶液
R2F3 ： 洗浄溶液

（コマンドの説明）
詳しいプログラムの解説は 62 ページ～を参照。

FLOW　　10
流速を 10µl/min に設定している。

DILUTE R2E1 R2E2 R2E3 50
R2E1 のサンプルと R2E2 のサンプルを等量とり、R2E3 で混合液を調製する。
ここでは、EDC と NHS の混合液を作成している。この操作によって、混合液が 200µl 作成される。50 は R2E1 の混合割合が 50%であることを示している。

***　INJECT　　R2E3 70**
調製した混合液を 70µl インジェクトし、センサー表面を活性化する。
添加時間 7 分。7 分間の添加で CM デキストランのおよそ 40%が活性化されることになる。目的によって時間を増減する。残存カルボキシル基を少なくしたい場合には、この活性化時間を長くする。活性化時間と固定化量との関係は、約 10 分間まで比例関係である。

INJECT R2A1 70
R2A1 のポジションにあるリガンドを 70µl インジェクトし、カップリングを行う。
添加時間 7 分。
サンプルは添加量 + 30µl（この場合は 100µl）を用意する。

***　INJECT　　R2E4 70**
R2E4 のポジションにある 1 M エタノールアミンを 70µl インジェクトし、残余の活性型 NHS 基をブロッキングする。EDC と NHS の混合液の添加時間と同じ時間添加する。
サンプルは添加量 + 30µl（この場合は 100µl）を用意する。

***　INJECT　　R2F3 10**
R2F3 のポジションにある洗浄溶液を 10µl インジェクトすることで、センサーチップ表面を簡単に洗浄する。通常は 10mM Gly-HCl（pH 1.5～2.0）あるいは 10～50mM NaOH 等を使用する。1 回のインジェクションは 1 分間以内にする。

ファイルの呼び出しおよび修正における注意事項・解説

① 試薬およびサンプルの位置と添加量は自由に変更できる。変更する場合には、プログラム中のサンプル位置および添加容量を変更する。

② リガンドの希釈液については、21 ページのプレコンセントレーションの項を参考にする。

③ 洗浄溶液の添加は非特異結合により、結合しているリガンドを洗浄するために行うものである。不必要な場合には省略する。

④ C：＼biacore1000＼guide＼methods 中にあるプログラムは書き直さないようにする。書き直す場合には、自分のフォルダーにオリジナルプログラムをコピーし、上書きするようにする。

2）Methodの編集

以下の方法で、作成あるいは修正したプログラムのコマンドの文字を全部大文字にし、行をそろえることができる。

Edit → Adjust Method → Second あるいは**Minute**をクリックする。

```
define aprog immob
caption immobilization
              flow              5
              dilute            r2e1 r2e2 r2e3
  *           inject            r2e3 35
-0:10         rpoint            baseline     -b
end
```

↓（**Edit → Adjust　Method → Minute** すると）

```
      DEFINE APROG immob
                CAPTION   immobilization
                FLOW      5
                DILUTE    r2e1 r2e2 r2e3
          *     INJECT    r2e3 35
        -0:10   RPOINT    baseline -b
      END
```

と変更される。

METHOD の編集における注意事項・解説

① この操作はプログラムを実行する上で必ずしも必要ではない。プログラムは大文字と小文字のどちらを使用してもかまわない。また、コマンドとコマンドの間隔も任意である（1 スペース以上あれば良い）。

② レポートポイントの時間表示を秒表示にしたい時には Second を、また、分表示にしたい時には Minute を選択する。

3）エラーの検索

作成したプログラム中に言語等の誤りがあるかを検索する。

Run → **Prerun Method**をクリックする。

↓

エラーがある場合には以下の様なメッセージが現れる。

↓

プログラム中にエラーの内容が表示されるので、**OK** をクリック後、訂正する。

```
>> Expected: '1','2','3','4'
FLOWCELL     5
>>
```

マークのある項にエラーがあるので、正しく訂正し、もう一度**Prerun Method**を実行する。（上下のメッセージは消去する必要はない）

エラーメッセージが表示されなければ、エラーがないことを示す。

エラーの検索における注意事項・解説

① 実際にセットしたサンプルの位置は認識しないので、サンプルの位置を間違えないようにする。

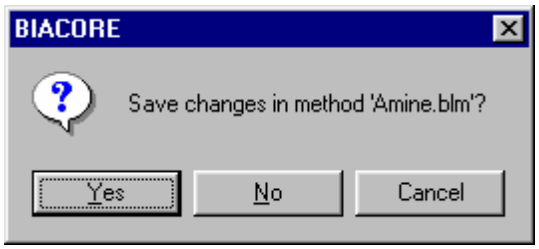
② プログラム実行前には必ず **Run** → **Prerun Method** を実行する。

4）プログラムの実行

Run → **Run Method**をクリックする。

↓

呼び出してきたプログラム（amine.blm）の内容を書き直した場合、以下のメッセージが表示される。



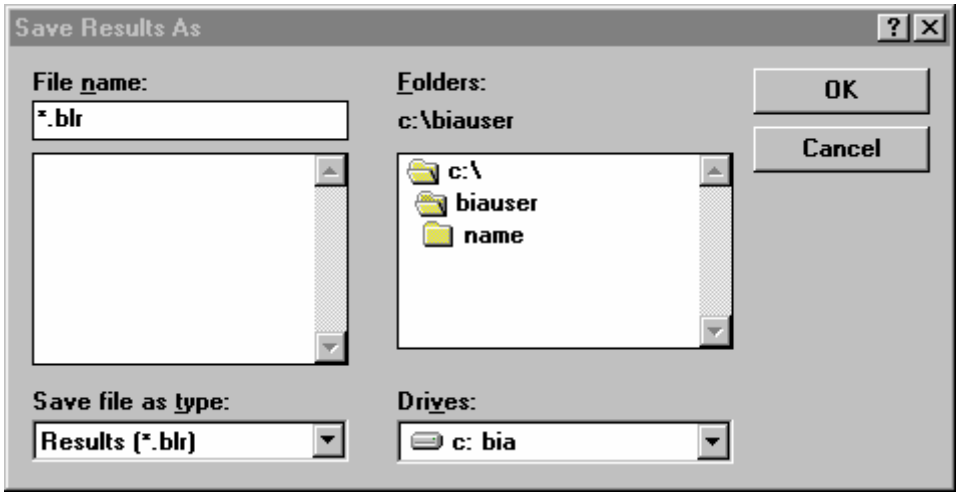
↓

通常は"No"をクリックする。

ここで"Yes"をクリックすると元のファイルが書き直おされる。基本となるメソッドファイルは書き換えないよう注意する。

↓

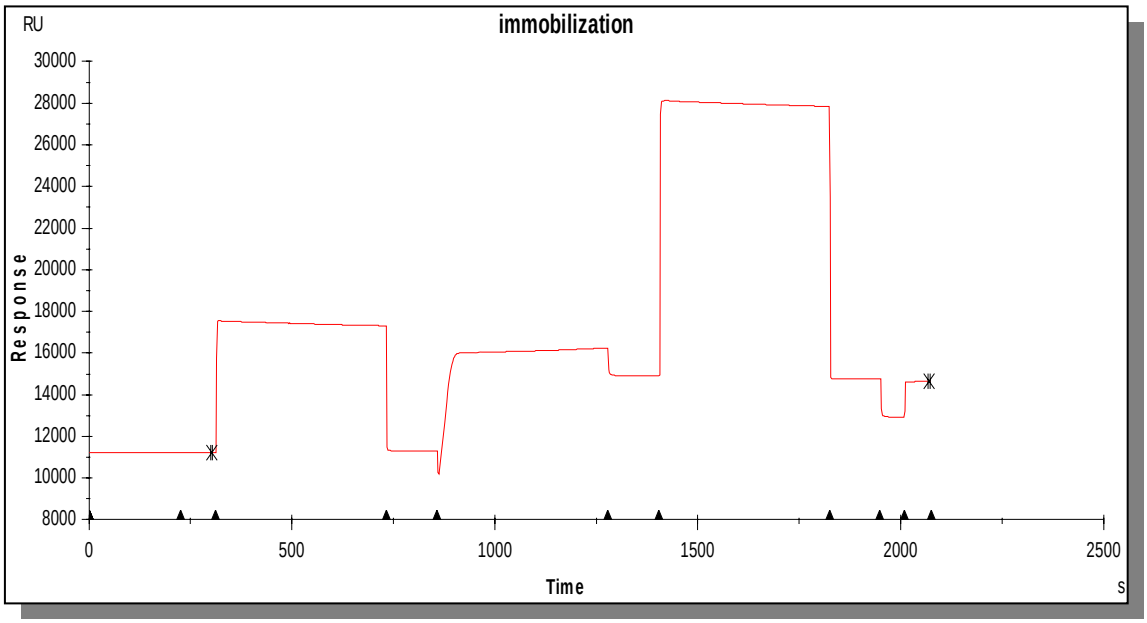
保存先の各自のフォルダーを指定し、ファイル名を入力し、**OK**をクリックする。



↓

プログラムが実行され、測定が開始する。

（固定化のセンサーグラム）



Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id
1	immob	302.5	11229.7	0.03	Yes	0	BASELINE
1	immob	2070.5	14635.4	0.05	No	3405.7	immobilization

（重要）

実行後にプログラムを強制終了したい場合には、キーボードの

Ctrl（左下）＋ Break（右上）

を同時に押す。

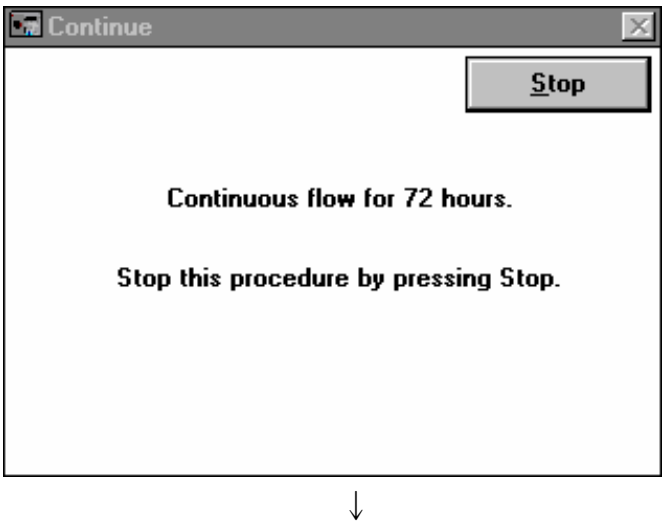
プログラムの実行における注意事項・解説

①プログラムを保存しなかった場合でも、MethodはResultファイルの中に保存される。
Resultファイルの**View** → **Method...**をクリックすれば、その時のMethodを見ることができる。また、そのMethodを再実行することも可能である。

②拡張子 .blm 等は省略しても自動的に書き込まれる。

5）プログラムの終了

プログラムが終了すると、**Continue** 状態になる（プログラムの MAIN ボックスの APPEND CONTINUE による）。



↓

Stopをクリックし、Continueを停止する。
データは、先に入力したファイル名で保存されている。

固定化全体における注意事項

固定化量は実験の目的によって調節する必要がある。

① **特異的結合の確認実験**

特異的な結合を確認する実験の場合には、アナライトのレスポンスが十分得られるような固定化量があればよい。したがって、リガンドの固定化量は多くてもかまわない。感度を良くするためにも固定化量を多くする方が理想的である。特に、アナライトが低分子の場合には、リガンドの固定化量を十分に多くしなければならない。

リガンドの固定化量とアナライトのレスポンスとの関係は、それぞれの分子量によって決まる。固定化したリガンドにアナライトが最大どれだけ結合するか以下の式で算出することができる。

アナライトの結合量（最大結合量 Rmax）
=アナライトの分子量(Da) × リガンドの固定化量（RU） / リガンドの分子量(Da) × S
s はリガンドの結合部位数

（例） リガンドの分子量 50,000 Da
リガンド固定化量 1,000 RU
リガンド結合部位数 1
アナライト分子量 20,000

上記の場合、アナライトの最大結合量（Rmax）は以下の値となる。

アナライトの最大結合量（Rmax）= 20,000 × 1,000 / 50,000 × 1 = 400RU

特に低分子のアナライトを使用する場合には、アナライトの最大結合量が最低でも 50～100RU 程度は必要であるので注意する。

② **濃度測定**

濃度測定を行う場合には、固定化量はできるだけ多くする。目安としては 10,000～15,000RU 程度は固定化したい。固定化量を多くするとスタンダードサンプルを使用した検量線の直線性がより高くなる。

③ **応速度定数（結合速度定数（k_a）、解離速度定数(k_d)）の算出**

反応速度定数（Kinetics Parameter）を算出する場合には、固定化量はできるだけ抑える必要がある。至適固定化量は以下の式から得られる最小固定化量と最大固定化量の間の固定化量（ RU ）を目安にする。

最小固定化量

200 × 1/S × （リガンドの分子量／アナライトの分子量）

最大固定化量

1000 × 1/S × (リガンドの分子量／アナライトの分子量）

S はリガンドの結合部位数

例えば、50kDal のリガンドと 120kDal のアナライトを使用する場合のリガンドの固定化量は（S=1 として）、
最小固定化量　200 × 1/1×（50,000/120,000）＝ 83 RU　から
最大固定化量 1000 × 1/1×（50,000/120,000）＝ 417 RU　の間となる。

固定化量を調節する場合には、**Manual　Inject** を使用すると便利である（35 ページ参照）。

3-4. MANUAL INJECT を用いた固定化量の調節方法

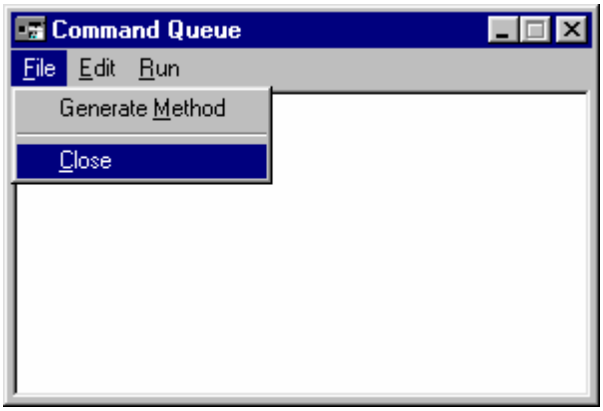
Manual Inject は、サンプルのインジェクトを小刻みに繰り返すことのできるコマンドであり、この方法を使用することで、厳密な固定化量の調節を行うことができる。このコマンドはマニュアル操作でのみ使用できる。よって、この操作は全ての段階をマニュアル操作で行う（プログラム操作では行えない）。NHS 活性化やエタノールアミンブロッキング時は通常の INJECT を使用し、**リガンドのインジェクト時に MANUAL INJECT を使用する。**

アイコン（ ）あるいは**Run → Run Sensorgram**をクリックし、センサーグラムをスタートさせる（22 ページ参照）。

Manual Inject を使用する場合には、**Command Queue** を閉じておく必要がある。

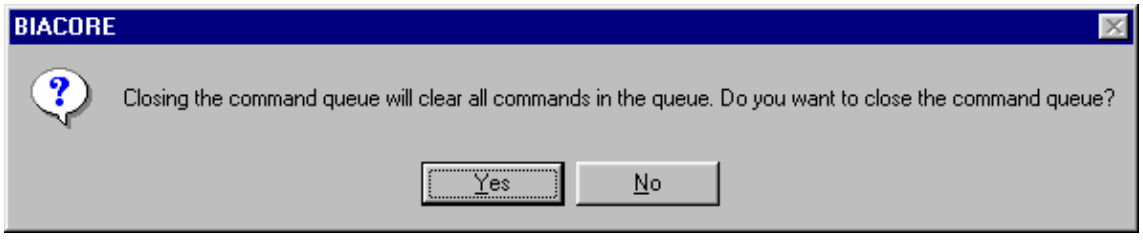
画面上の

をクリックする。



↓

File → Closeをクリックする。



Yesをクリックする。

↓

画面上から

が消える。

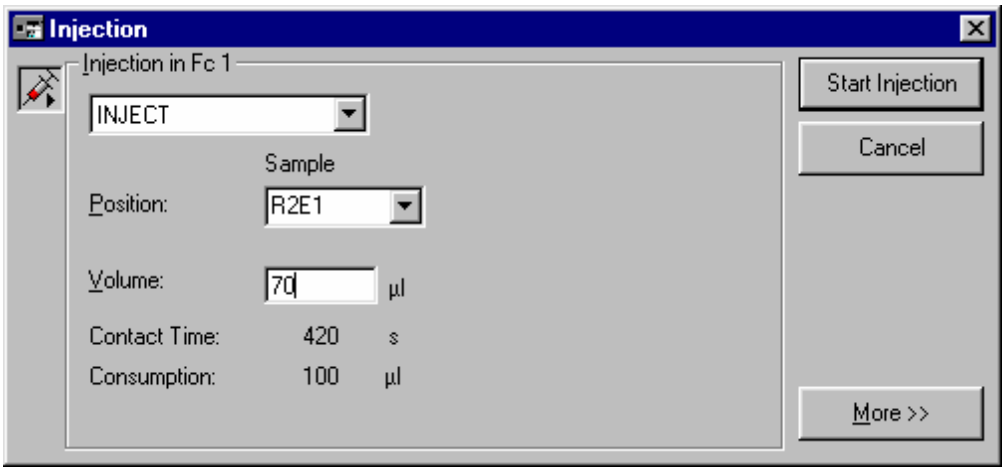
1）NHSの活性化

NHS/EDC の当量混合液（自分で混合する）をラックにセットする。

↓

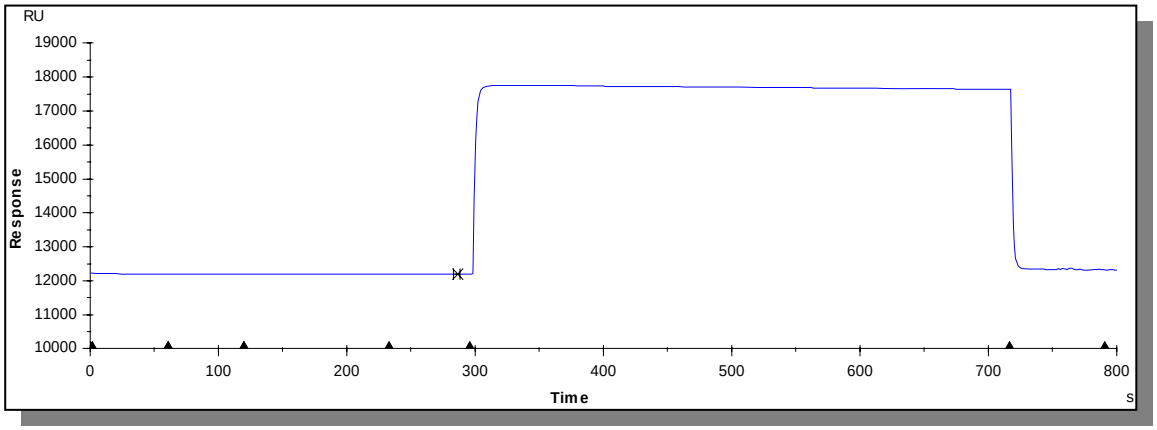
アイコン（ ）あるいは**Command** → **Inject...**をクリックする。

↓



サンプル位置および添加容量を入力し、**Start Injection** をクリックする。
（７分間活性化が基本となる）

↓

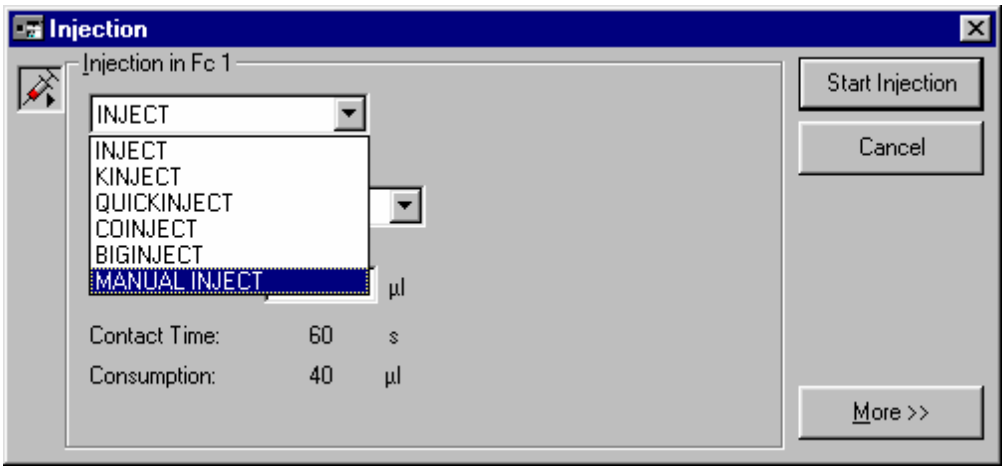


NHS 活性化反応が行われる。

↓

2）リガンドの添加

アイコン（ ）あるいは**Command → Inject...**をクリックする。

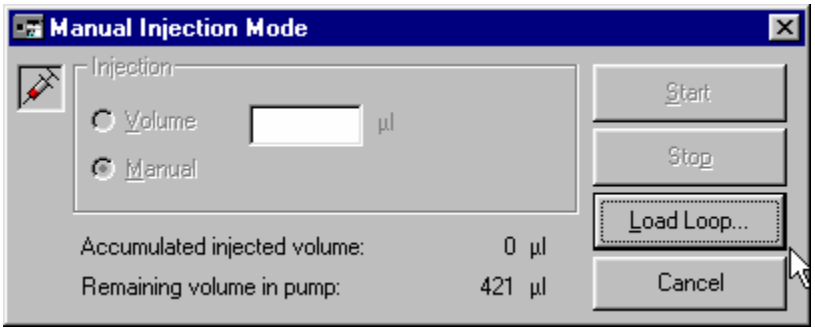


MANUAL INJECTを選択し、**Start Injection**をクリックする。

↓

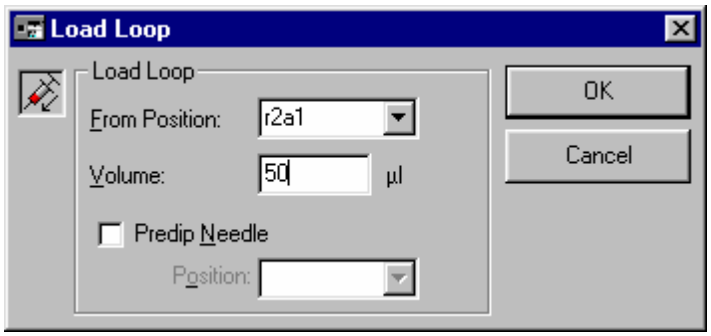
をクリックする。

↓



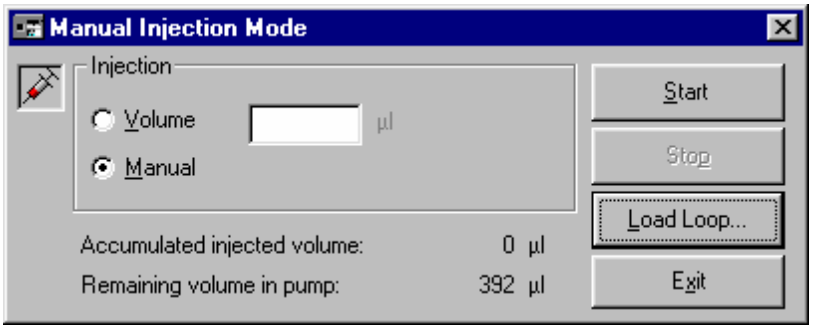
をクリックする。

↓



サンプル位置およびサンプルロード量（2～120µl）を入力後、**OK** をクリックする。（このとき、バイアル中には**サンプルロード量＋30µl** が必要となる。）

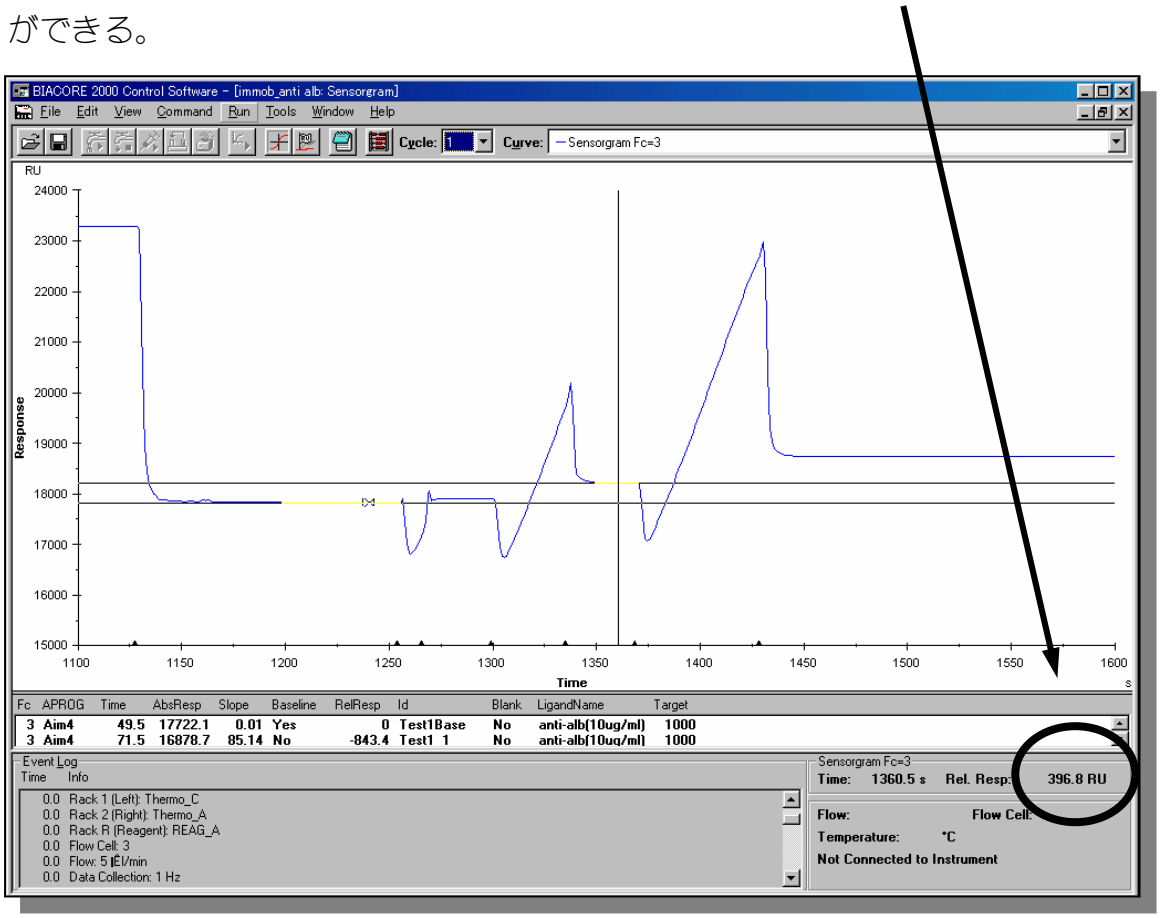
↓



Manualを選択し、**Start**をクリックするとリガンドが添加され、**Stop**をクリックすると停止する。この操作を繰り返し、固定化量を調節する。（**1～100µlの間で添加可能**）

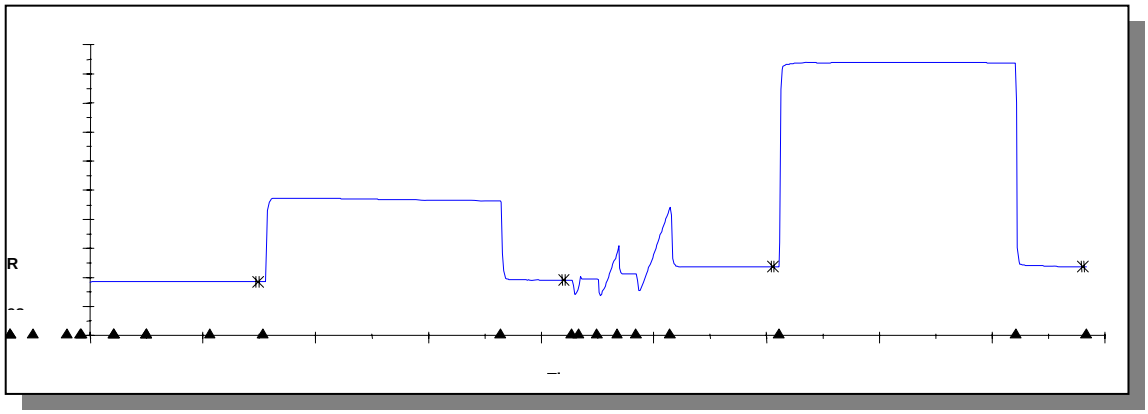
（結合量の確認）

アイコン（ ）をクリックし、リファレンスラインを表示させ、リガンドインジェクション前に移動後、**View** → **Baseline**をクリックすると、画面下のレスポンスが 0 になる。さらに、添加後に移動させると、結合量を表示させることができる。



3）エタノールアミンの添加

NHS/EDC 混合液の添加時と同様に、通常の INJECT コマンドを使用し、エタノールアミンを添加する。必ず、NHS/EDC 添加時間と同じ添加時間する。



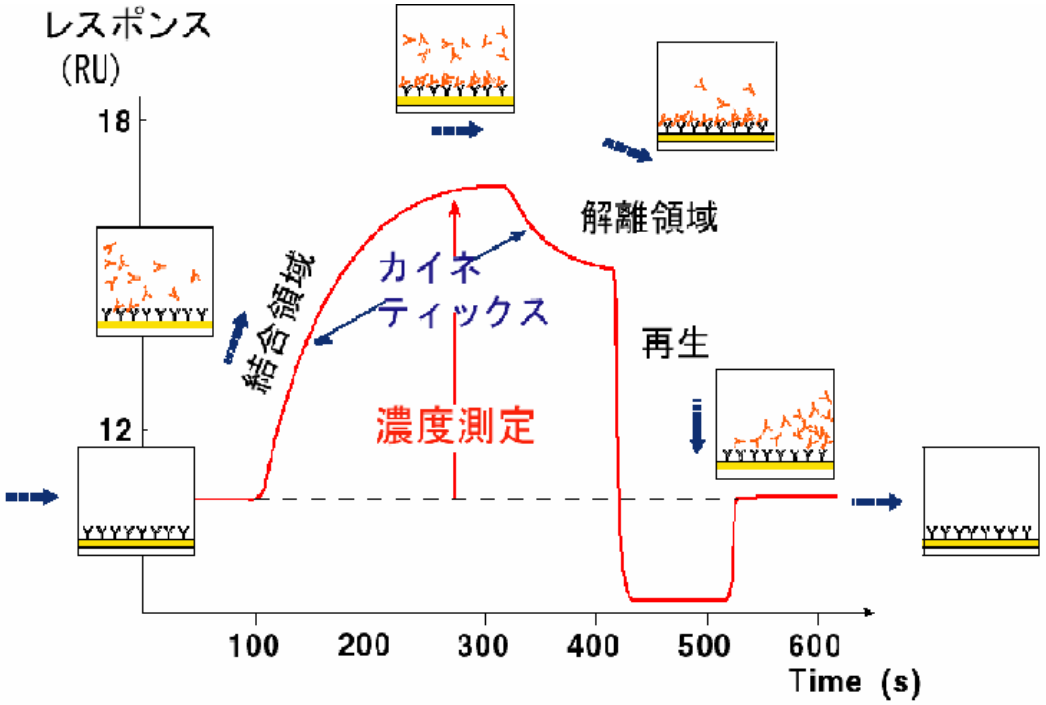
Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Blank	LigandName	Target
3	Aim4	677.5	17706.0	0.01	Yes	0	Baseline	No	anti-alb(10ug/ml)	1000
3	Aim4	1240.5	17823.2	-0.12	No	117.2	EDC/NHS	No	anti-alb(10ug/ml)	1000
3	Aim4	1611.5	18734.2	0.02	No	1028.3	Ligand	No	anti-alb(10ug/ml)	1000
3	Aim4	2161.5	18736.3	0.19	No	1030.3	Ethanolamine	No	anti-alb(10ug/ml)	1000

この方法を用いることで、任意の固定化量に調節できる。

4. 相互作用の検討

アナライト

相互作用を見る場合、リガンドの固定化表面にインジェクトする方の分子を"アナライト"という。**アナライトとしては、血清や培養上清等のクルード（crude）なサンプルも使用することができるが、不溶性の粒子等は遠心などで除去する。**
また、正確な反応速度定数を算出する場合には、アナライトもできるだけ精製したものを使用する。
サンプルは、できるだけランニング緩衝液で希釈する。緩衝液の組成がランニング緩衝液と異なる場合には、結合領域と解離領域の測定条件が異なることになる。また、溶液効果（Bulk Effect）が発生する場合がある（46 ページ参照）。
必要があれば、ゲルろ過等を使用しランニング緩衝液で緩衝液交換するか、ランニング緩衝液をサンプル溶解液の条件に変更する。
アナライト濃度はアフィニティーや分子量にもよるが、およそ数十ng/ml～数百μg/mlで行う。**反応速度定数を算出する場合には、予想されるK_D（解離定数）値の 1/10～10 倍の濃度で分析すると、良好な結果が得られる。**
また、相互作用測定では、必ずリファレンスセルにもアナライト溶液を添加し、得られたデータを差し引くことが重要である。



再生操作

結合したアナライトを強制的に全部解離させる操作を再生（Regeneration）操作という。再生操作は、以下の条件を満たしていることが必要である。

① リガンドの活性を失わないこと
② リガンドがセンサーチップ表面から遊離しないこと
③ アナライトを完全に解離させること

再生溶液

再生溶液として以下のような種類がある。詳しくは 46 ページ参照。

① 高塩濃度溶液
② pH を変化させる溶液（酸性溶液あるいはアルカリ溶液）
③ キレート剤（多価カチオン依存性反応の場合）
④ 界面活性剤
⑤ 有機溶媒
⑥ 変性剤

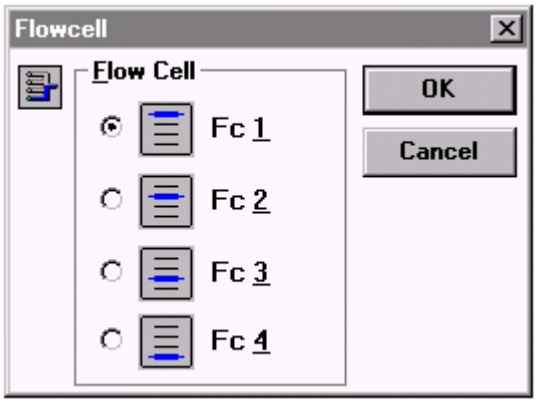
再生溶液を添加する場合には、30 秒～1 分間の短いインジェクションで行い、充分再生されない場合には、この短時間のインジェクションを数回繰り返す（長時間の添加は避ける）。

4-1. マニュアル操作による相互作用の検討

サンプルをラックにセットする。

↓

アイコン（ ）あるいは**Run** → **Run sensorgram...**をクリックし、センサーグラムをスタートする。



使用するフローセルの選択を行い、**OK** をクリックする。

↓

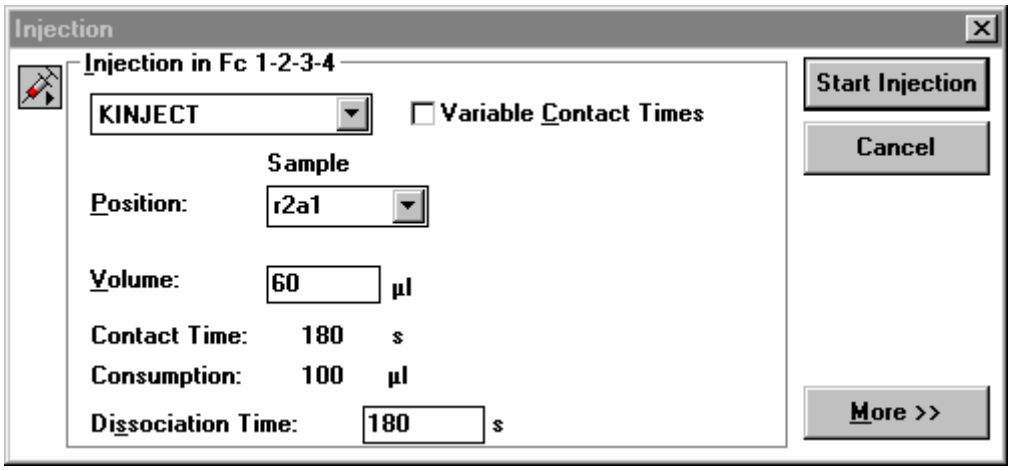
流速を設定し、**OK** をクリックする。

反応速度定数（k_a, k_d）を算出する場合には比較的速い
流速（20～50µl/min）に設定する。

↓

アイコン（ ）あるいは**Command** → **Inject...**をクリックする。

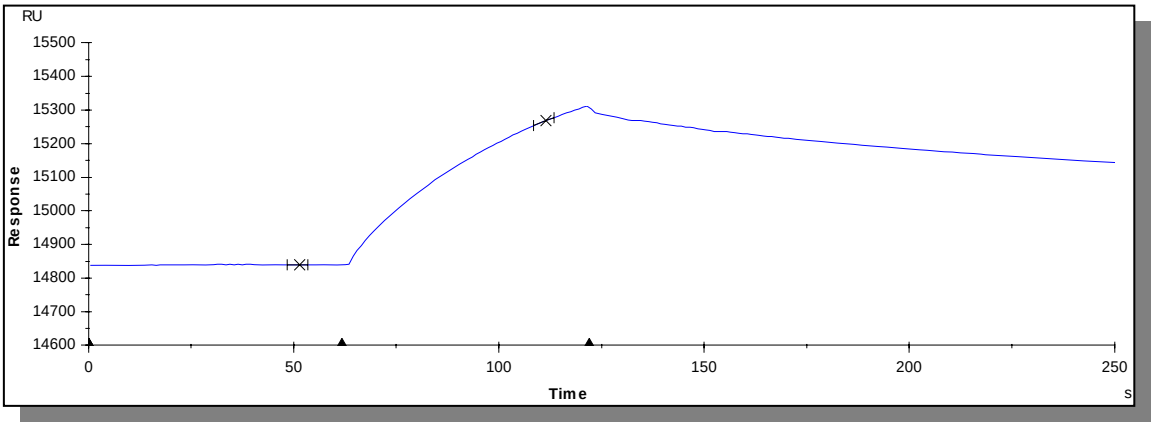
INJECT の右の▼をクリックすると各種のインジェクトコマンドが表示される(下表参照)。



反応速度定数を求める場合には、KINJECT の添加方法が有効である。

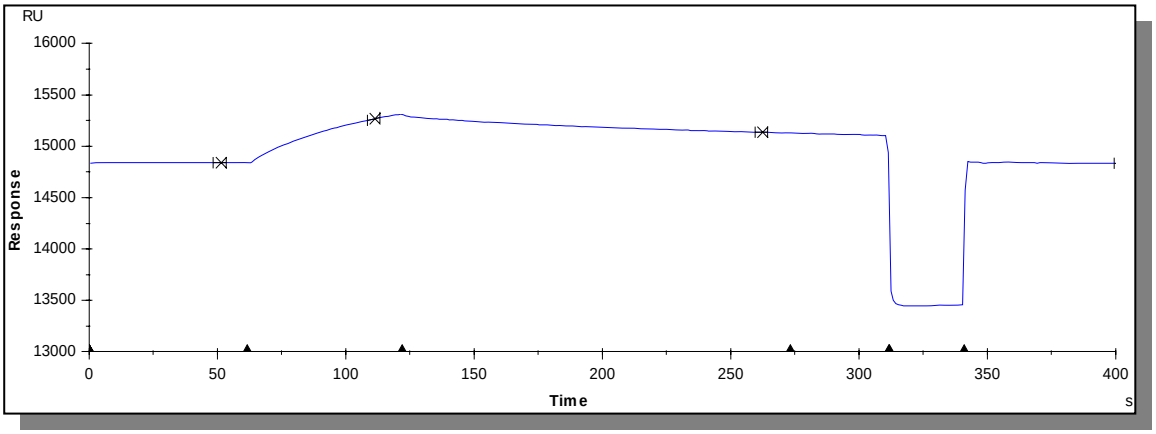
インジェクトコマンドの種類

コマンド	内容	試料添加量	試料消費量
INJECT	通常使用のモード	5-325µl	+30µl
KINJECT	反応速度を算出する際に有効 解離時間の設定が可能	10-250µl	+40µl
QUICKINJECT	試料の必要量が少ない 測定開始までの待ち時間が少ない	5-325µl	+10µl
COINJECT	２つのサンプルを間隔を空けず連続して添加できる		
	Sample 1：	10-100µl	+40µl
	Sample 2：	15-250µl	+40µl
BIGINJECT	大容量の試料を添加する	325-750µl	+52µl
MANUAL INJECT		35 ページを参照	



解離状態を観察後、再生溶液（45 ページ参照）を添加し（この場合は INJECT で良い）、結合しているアナライトを洗い流す。

↓



↓

測定を終了する場合、アイコン（ ）あるいは**Run → Stop Sensorgram**をクリックし、測定を終了する。

レポートポイント作成方法については、14 ページを参照。
通常は、サンプル添加前 10 秒程度のポイントでベースラインをとり、サンプル添加終了 10～30 秒後を結合量として表示させる。また、再生操作の確認のため再生溶液添加後 30 秒～1 分後のベースラインが安定した点でとる。

↓

同じサンプル溶液を用いて、同様の手順にてリファレンスセルへの添加を行い、データをとる。（データの差し引きは BIAevaluation ソフトウェアで行う。）

再生溶液について

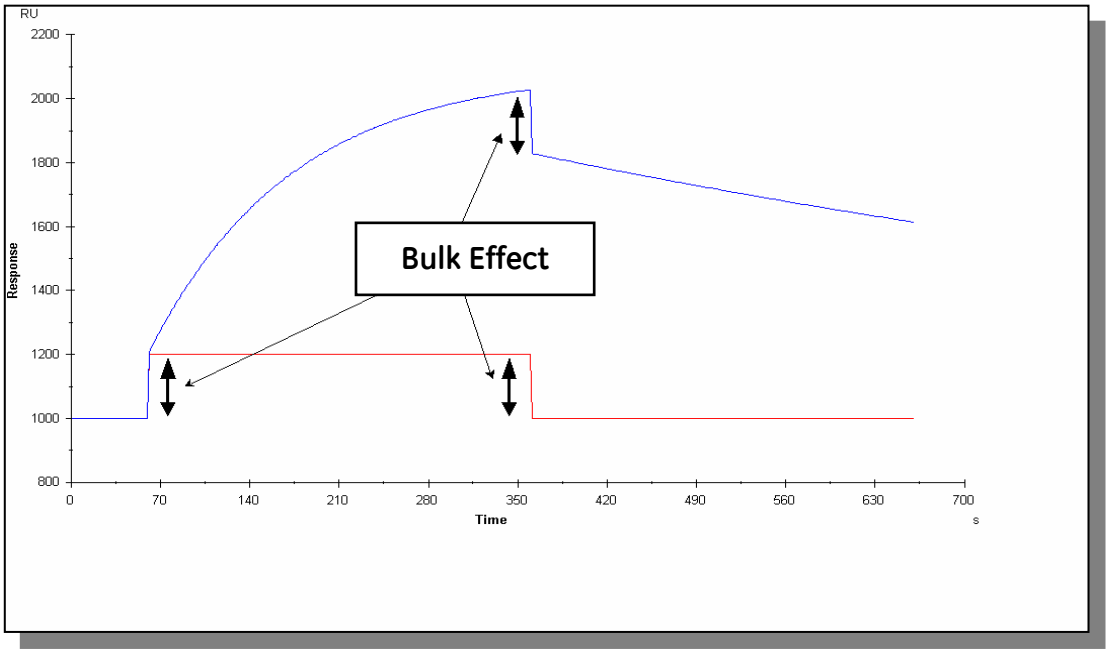
再生溶液は通常以下のようなものが使用される。結合したアナライトが完全に再生され、かつ固定化したリガンドの活性が保持される条件を選択しなければならない。

再生溶液の例

試薬	濃度あるいは pH
（塩）	
NaCl	< 1M
（酸性条件）	
10mM Gly-HCl	> pH1.5
HCl	< 100mM
Phosphoric acid	< 100mM
Formic acid	< 20%
（アルカリ条件）	
10mM Gly-NaOH	< pH12
NaOH	< 100mM
Etanolamine	< 100mM
Etanolamine-HCl	< 1M
（キレート剤） －多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	< 0.35M
（界面活性剤）	
Surfactant P-20 (Tween 20)	< 5%
Triton X-100	< 5%
SDS	< 0.5%
Octylglycoside	< 40mM
（有機溶媒）	
Acetonitrile	< 20%
DMSO	< 8%
Ethyleneglycol in HBS buffer	< 50%
Ethanol	< 20%
Formamide	< 40%
（変性剤）	
Guanidine-HCl	< 5M
Urea	< 8M

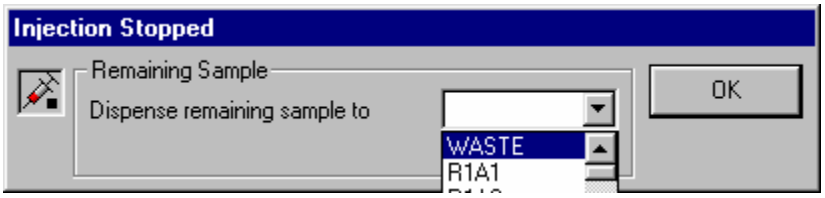
サンプルの調製

サンプルは、できるだけランニング緩衝液で希釈する。サンプル溶液とランニング緩衝液の組成が異なる場合には、溶液効果(Bulk effect)が大きくなる場合がある。このような場合には、センサーグラムのランニング緩衝液とアナライト溶液の切り替え点が不連続になる。



インジェクトの中止

インジェクトを途中で中止したい場合には、アイコン（ ）もしくは**Command → Stop Inject**をクリックする。ニードルに残ったサンプルは設定したポジション（あるいはWASTE）に戻すことができる。

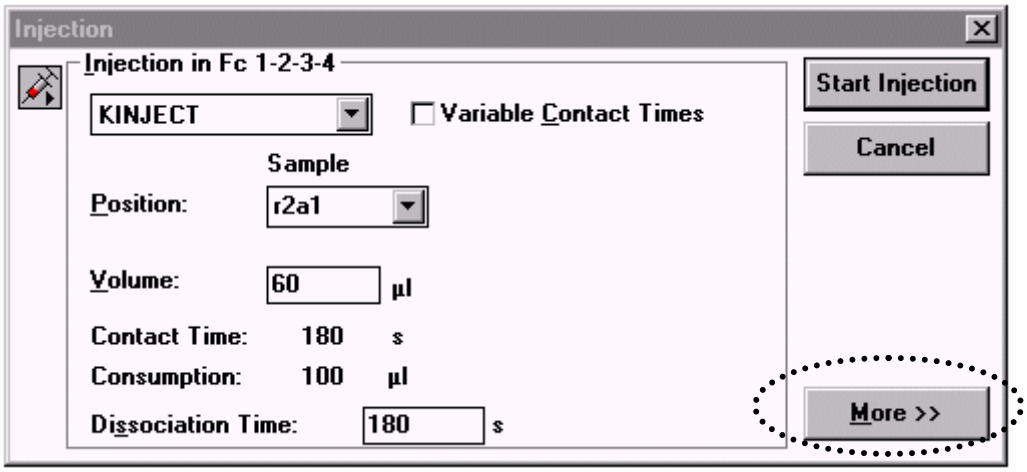


インジェクトコマンドの拡張機能

インジェクトコマンドには以下のような拡張機能がる。拡張機能を使用する場合には、

Injection ボックスの

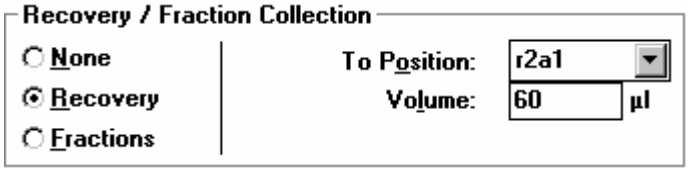
をクリックする。



① サンプルの回収

インジェクションしたサンプル溶液や、リガンドと結合したアナライトを再生溶液中に解離させた状態で回収することが可能である。

Recoveryをマークして、サンプルを回収するポジションと回収量を入力する。

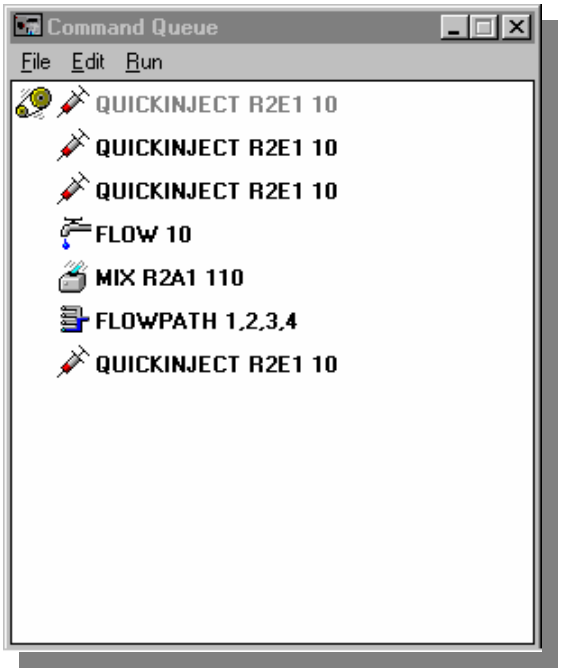


② Extra Cleanup

クルードなサンプル等を使用した場合、添加後の洗浄を通常よりも良くしたい場合には、**Extra Cleanup**にマークを入れる。

Command　Queue について

マニュアル操作でセンサーグラムを開始すると**Command Queue** ボックスのアイコンがセンサーグラム画面右上に表示され、マニュアル操作で入力したコマンドを確認することができる。また、実行したいコマンドを幾つも記憶させることができ、入力したコマンドは上から順番に実行される。入力したコマンドの１つを削除したい場合には **Edit** → **Delete**、コマンド間にコマンドを挿入したい場合には **Edit** → **Insert**をクリックし、新たにコマンドを入力する。



Command Queue ボックスは右上の縮小ボタンをクリックしてアイコン化（縮小）することができる。また、アイコンをクリックすると再びボックスを開くことができる。

＊Command Queue は、コントロールソフトの version によって使用できない場合があるので注意する。

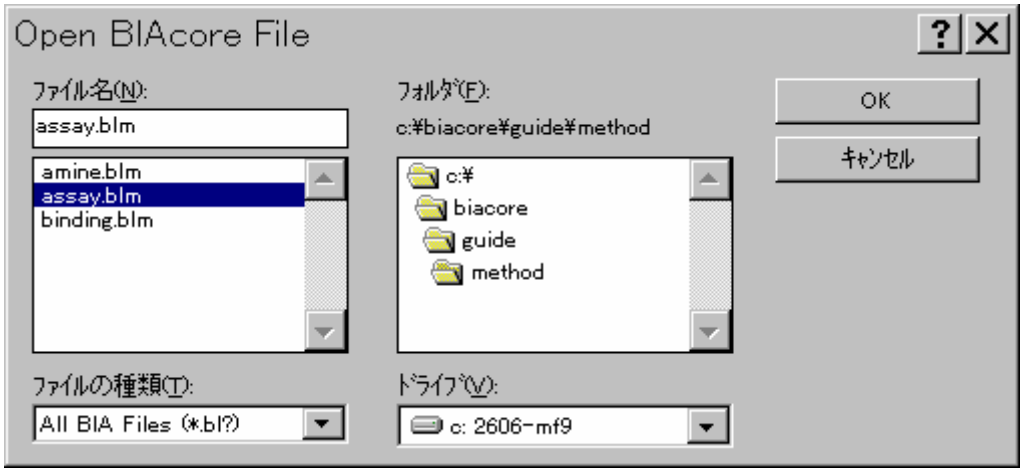
4-2. プログラムによる相互作用の検討

固定化と同様に基本となるメソッドファイルを呼び出し、修正後実行する。ここでは相互作用検討用のメソッドファイルである assay.blm を基本に説明する。プログラムの詳細については、62 ページ～を参照。

1）ファイルの呼び出し

アイコン（ ）あるいは**File** → **Open...**をクリックする。

↓



C：＼biacore1000＼guide＼methods とディレクトリーを開け、相互作用測定用のファイルである assay.blm を選択後、**OK** をクリックする。

（相互作用プログラム）

```
DEFINE APROG assay
  PARAM %pos %id %conc
  CAPTION    Binding of %ID(%conc) to immobilized antibody
             FLOW          20
      *      KINJECT       %pos 60 180
   -0:10     RPOINT        baseline -b
   2:10      RPOINT        bound
      *      QUICKINJECT   R2F3 20
   1:30      RPOINT        regeneration
END

MAIN
             RACK          1 thermo_b
             RACK          2 thermo_a
             flowcell      1
             APROG         assay R2A1 Sample 50ug/ml
             APROG         assay R2A2 Sample 25ug/ml
             APROG         assay R2A3 Sample 12.5ug/ml
             APROG         assay R2A4 Sample 6.25ug/ml
             flowcell      2
             APROG         assay R2A1 Sample 50ug/ml
             APROG         assay R2A2 Sample 25ug/ml
             APROG         assay R2A3 Sample 12.5ug/ml
             APROG         assay R2A4 Sample 6.25ug/ml
             APPEND        continue              !Continuous flow after aprog
END
```

このプログラムは、フローセル 1 がリガンド固定化セル、フローセル 2 をリファレンスセルとした場合の相互作用測定を想定したものである。

このプログラムにおけるサンプルの位置

サンプル位置	サンプル名(例)	濃度（例）
R2A1	Antigen	25μg /ml
R2A2	Antigen	12.5μg /ml
R2A3	Antigen	6.25μg /ml
R2A4	Antigen	3.125μg /ml
R2F3	再生溶液（10mM Gly-HCl (pH 1.75)）	

2）Methodの編集
固定化操作の項（28 ページ）参照。

3）エラーの検索
固定化操作の項（29 ページ）参照。

4）プログラムの実行
固定化操作の項（30 ページ）参照。

5）プログラムの終了
固定化操作の項（32 ページ）参照。

（重要）
実行後にプログラムを強制終了したい場合には、キーボードの

Ctrl（左下）＋Break（右上）

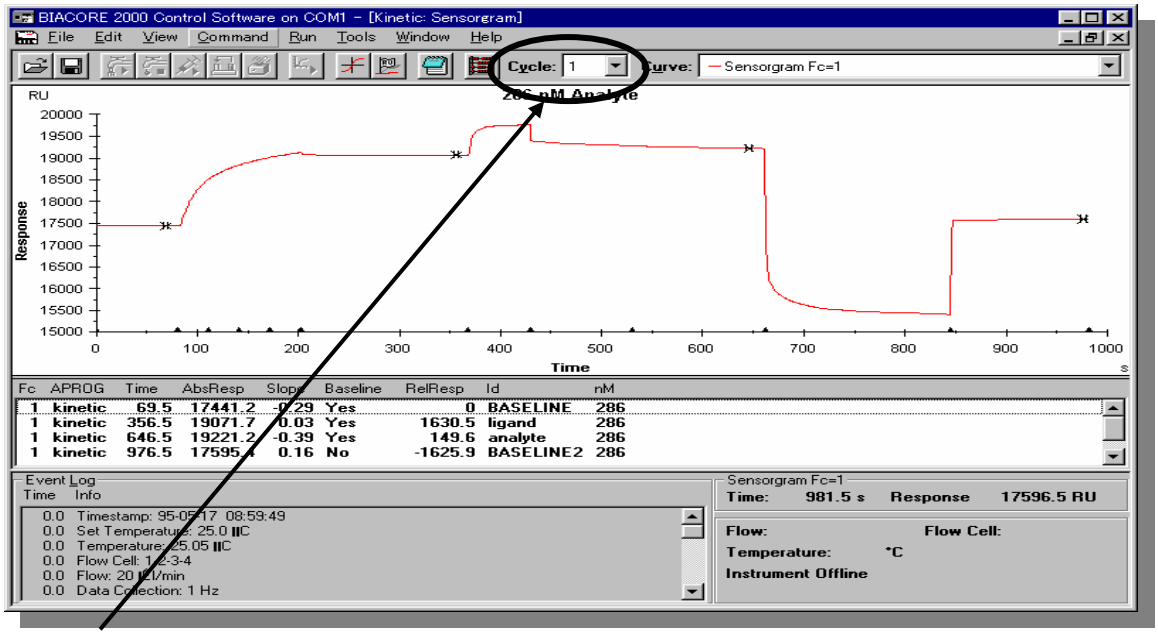
を同時に押す。

プログラムの実行における注意事項・解説

MethodファイルはResultファイル中に保存される。“Resultファイル”上で**View** → **Method...**をクリックすれば、センサーグラム作成時Methodが表示される。また、改めてそのMethodを実行することができる。

4-3.ファイルの保存様式

[4-2.]の相互作用プログラムを使用した場合、データは１つのサンプルにつき **1** つのグラフ（サイクル）として保存される。



Cycle 1 のサイクル番号を選択すると、他のサンプルのデータを表示できる。

１つのファイルの中にサンプル数だけCycleが存在することになる。

5.シャットダウン

5-1.実験の終了

実験が終了した場合には、次の方法のどちらかを行う。

1） Continue 状態での放置
2） 電源を落として終了

比較的頻繁（3 日以内に使用する）に使用する場合には、1 の Continue にする。3 日以上使用しない場合には、2 の電源を落として終了する。

1） Continueの実行

Tools → Working Tools... をクリックし、**Continue**を選択し、実行する。
5µl/min の流速で最大 72 時間、ランニング緩衝液を送り続ける操作を自動的に行う。週末に使用しないような場合に、Continue を実行する。72 時間の Continue でランニング緩衝液の消費量はおよそ 30ml 程度である。

2）電源を落として終了

電源を落とす場合には、基本的にシステムを水で洗浄して、Biacore の流路系の緩衝液を完全に除く（洗浄には洗浄用センサーチップを使用）。流路系等の塩の析出を防ぐために、必ず水で洗浄し電源を落とす。

以下の 2 つの方法がある。

① **MilliQ®水でPrime**
緩衝液ボトルを**MilliQ®水**ボトルに置き換え、**Tools → Working Tools...**をクリックし、**Prime**を実行する。

② **Close**
16 mm ガラスバイヤルに**MilliQ®水**を 3 ml入れ、**R2F3** におき、**Tools → Working Tools...** をクリックし、**Close**を実行する。

5-2.センサーチップの抜き取り（Undock）

Command → **Undock...**をクリックし、**Undock**を実行する。
↓
フロントパネルの Sensor Chip のインジケーターが点灯から点滅に変わったら、センサーチップを抜きとる。
↓
コントロールソフトウェア画面の**Dock**ボックスはキャンセルで消す。画面右上の端にあるクローズボタン（ ）または、**File** → **Exit**でソフトウェアを終了する。
↓
Biacore システム、コンピューター、モニター、プリンターの電源を Off にする。
↓
ランニング緩衝液、廃液入れをかたづける。

5-3.センサーチップの保存

実験に使用後 Undock したセンサーチップは、以下の方法で保存することができる。

1）Dry状態での保存

取り出したセンサーチップをパラフィルムで巻くか、50ml 容の蓋付きプラスチック管等に入れ、4℃で保存する。
安定なタンパク質や DNA を固定したセンサーチップの保存に用いる。

2）Wet状態での保存

取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを PBS 等の緩衝液を入れた容器（50 ml 容の蓋付きプラスチック管等）に入れ、4 ℃で保存する。
センサーチップを再 Dock する時には、シートについたバッファーを拭き取った後、カバーに戻し使用する。リガンドを固定してある側については、細くとがらせたキムワイプ等をセンサー部分の四角の隅に置き、余分なバッファーを吸い取る。リガンドを固定していない側のセンサー部分は反射面となるので、キムワイプ等で全体をきれいにふきとる。反射面に濁りや汚れ等がないように注意する。センサー部分以外の白い部分は、キムワイプ等でしっかり拭き取る。

どちらの方法を用いても、タンパク質の種類によっては保存中に変性することがあるので、再 Dock 後、活性を確認すること。

6.メンテナンス

6-1. メンテナンス

Biacore のメンテナンスは、**Working Tools**（**Tools → Working Tools...**）中のコマンドを用いて行う。

１） 実験を行う前

Prime

新しいセンサーチップを Dock した時やランニング緩衝液を交換した時に行う操作である。ポンプや IFC（マイクロ流路系）、オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄・置換する。（所要時間約 6 分間）

> Prime はランニング緩衝液でシステムを初期化する操作である。大きく塩濃度が変化する緩衝液や粘性の異なる緩衝液に交換する場合には、Prime を 2～3 回繰り返す。

２） ランニング緩衝液で洗浄したい場合

Flush

IFC とフローセルをランニング緩衝液で簡単に洗浄する。（所要時間約 3 分間）

Rinse

IFC、フローセル、回収カップをランニング緩衝液で、高流速で洗浄する。（所要時間約 8 分間）

> 通常の洗浄は実験の各段階で自動的に行われるが、粘性の高いサンプルや非常にクルードなサンプルを用いた時などに使用する。

３） 定期的な洗浄

次の洗浄操作を行う場合には、必ずメンテナンスチップか洗浄用のセンサーチップを使用する。また、コマンド終了後に MilliQ®水で 1～2 回程度 Prime を行うと良い。

① **Desorb（毎週 1 回が目安）**

IFC やフローセル等に付着したタンパク質や脂質を洗浄する操作である。
BIA メンテナンスキット中の **BIAdesorb solution 1（0.5% SDS 溶液）**および **BIAdesorb solution 2（50mM Gly-NaOH、pH9.5）**を使用する。

Thermorack A をラックポジション 2（右側）にセットし、R2F3 に 3ml の BIAdesorb solution 1 を、R2F4 に 3ml の BIAdesorb solution 2 をセットして行う。（所要時間約 22 分間）

・Biacore のメンテナンスにおいて **Desorb** は非常に重要である。特に、クルードなサンプルを流す場合には頻繁に行うようにする。
・メンテナンス用のセンサーチップ（使用済みチップなど）を利用する。
・設定温度は 20℃以下で行わない。
・BIAdesorb solution 1 は 4 ℃で保存すると結晶が析出するので、室温保存すること。
・Desorb 終了後は、MilliQ®水で Prime を 2～3 回程度実行する。

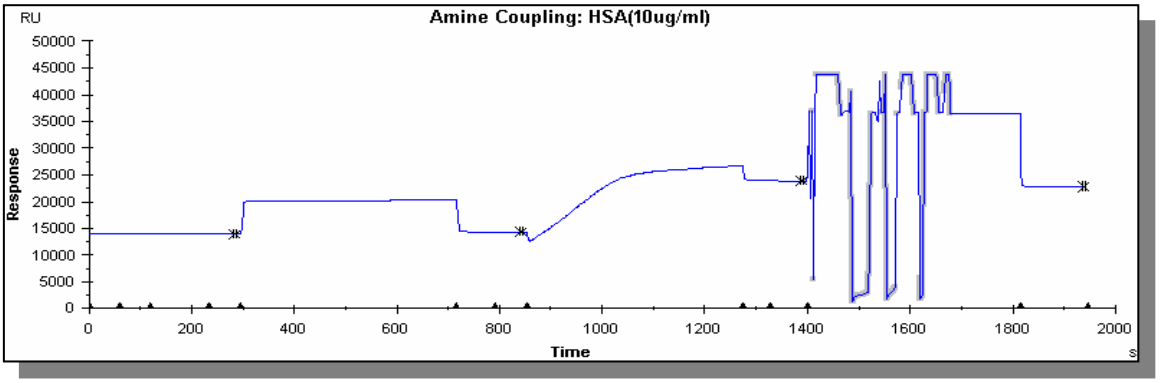
② **Sanitize**（毎月 1 回が目安）
IFC やフローセルを殺菌する操作である。**BIAdisinfectant　solution（次亜塩素酸ナトリウム溶液）**と **MilliQ®水**を使用する。

ステップ 1：1.5ml の BIAdisinfectant　solution を BIA メンテナンスキット内の専用の容器に入れ、20 ml の MilliQ®水で希釈し、ランニング緩衝液の位置に置き実行する。
ステップ 2：MilliQ®水 15ml をランニング緩衝液の位置に置き実行する。
（所要時間約 45 分間）

・病原性があるサンプル等を使用したときは、適時 **Sanitize** を実行する。
・メンテナンス用のセンサーチップ（使用済みチップなど）を利用する。
・Sanitize 終了後は、MilliQ®水で Prime を 2～3 回程度実行する。

6-2. エアー（Air）の除去

脱気していない緩衝液を使用した場合や、エアーをインジェクトすると、エアーが流路系内に留まってしまうことがある。
エアーが流路系内に留まった場合には、センサーグラムは太い灰色の線になる。



このような場合には、以下の操作を順次行う。

① **Tools** → **Working Tools...** → **Prime**、**Flush**、あるいは **Rinse** を組み合わせて数回行う。

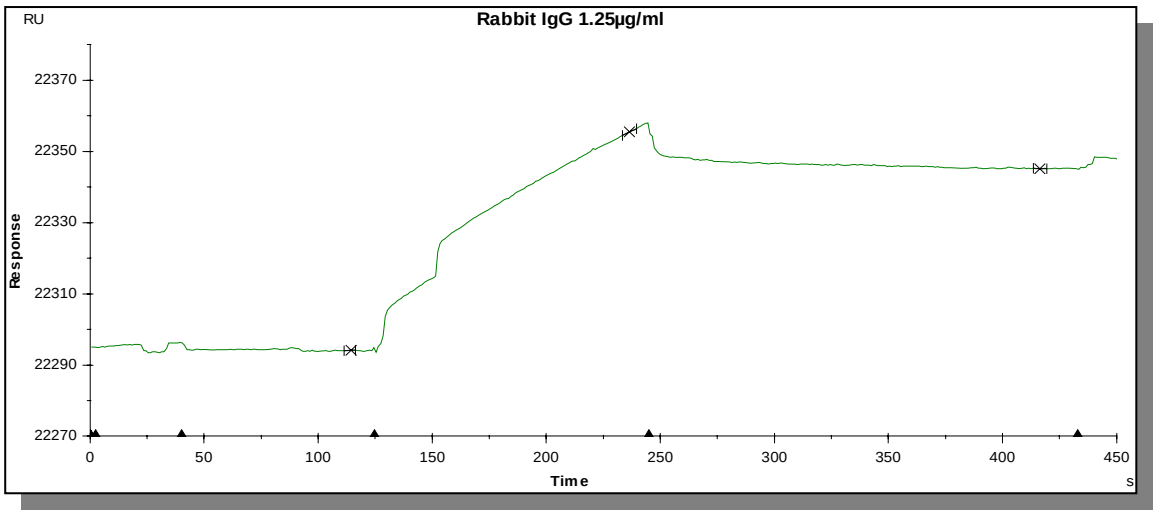
② **Tools** → **Service Tools...** → **Unclogging** を実行し、高流速でランニング緩衝液を流す。

③ 充分脱気したランニング緩衝液をセットし、**Prime** を数回繰り返す。

上記の操作終了後、改善がみられない場合には、マイクロ流路系（IFC）の劣化の可能性も考えられるので、システムチェックを行って機械の状態を把握する（58 ページ参照）。

6-3.流路系に詰まりがあるとき

不溶性のサンプルや吸着性の高いサンプルを使用すると、流路が詰まる場合があり、センサーグラムに乱れが発生することがある。



このような場合には、**Tools** → **Service Tools...** の **Unclogging** を実行する。ランニング緩衝液を高流速で流すことで、詰まりを除去する。

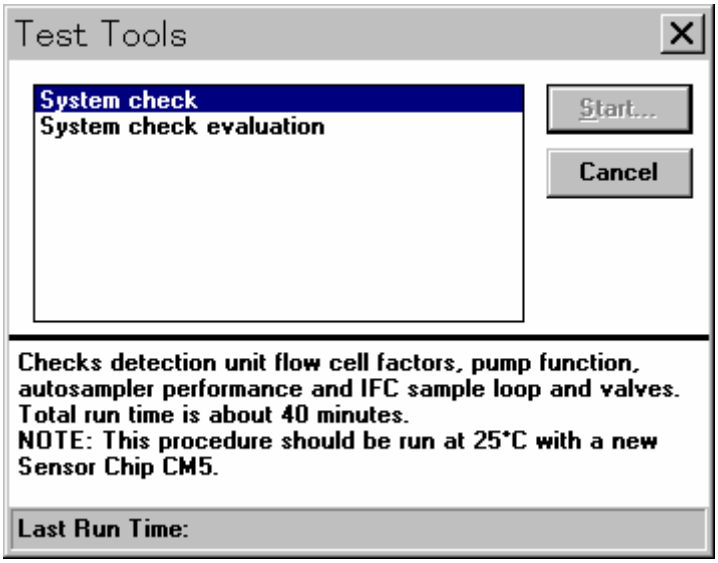
6-4. システムチェック

ベースラインがドリフト、エアーが頻繁に入るなど機械の調子が思わしくない場合には、以下の方法でシステムチェックを行う。

使用するもの
新しいセンサーチップ **CM5 (固定化済みのチップは使用できない)**
HBS-EP 緩衝液
9mm ガラスバイヤル
BIAtest solution (BIA maintenance kit)

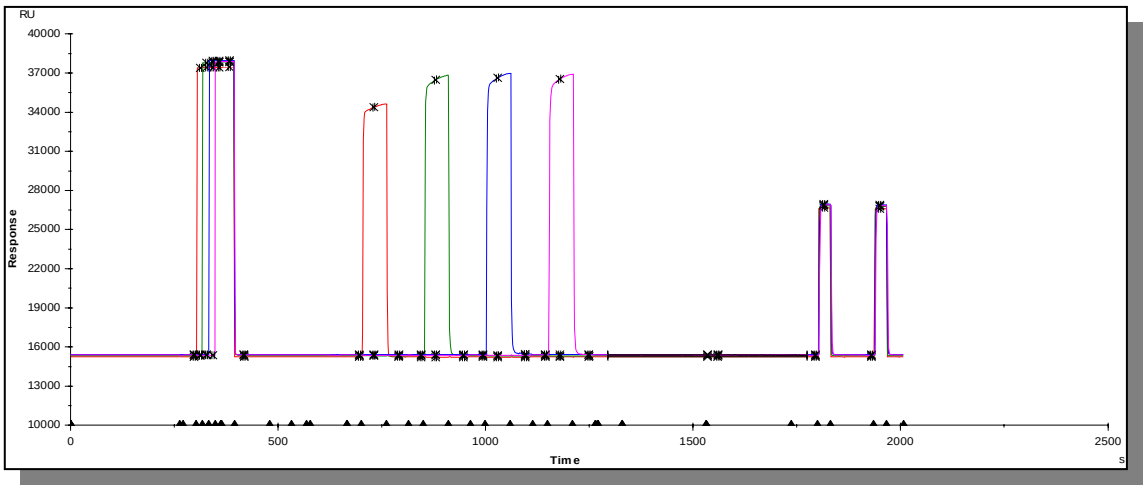
システムチェックで使用したセンサーチップは、その後実験で利用できる。

（方法）
BIA maintenance kit 中の **BIAtest solution** 1ml を 9mm のガラスバイヤルに入れ、R2F1 にセットする（あらかじめ、ラック 2 に Thermo_A をセットしておく）。
↓
空の 9mm のガラスバイヤル 4 本を R2E1 から R2E4 にセットする。
↓
Tools → **Test tools** → **System check** をクリックする。

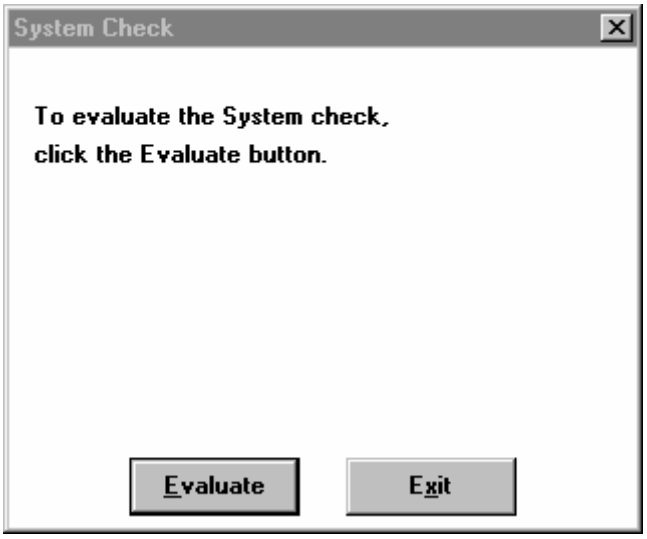

Test Tools
System check
System check evaluation
Start...
Cancel
Checks detection unit flow cell factors, pump function, autosampler performance and IFC sample loop and valves.
Total run time is about 40 minutes.
NOTE: This procedure should be run at 25°C with a new Sensor Chip CM5.
Last Run Time:

Start...をクリックする。（所要時間：約 50 分）

（結果の表示）
画面上には、以下のようなセンサーグラムが表示される。

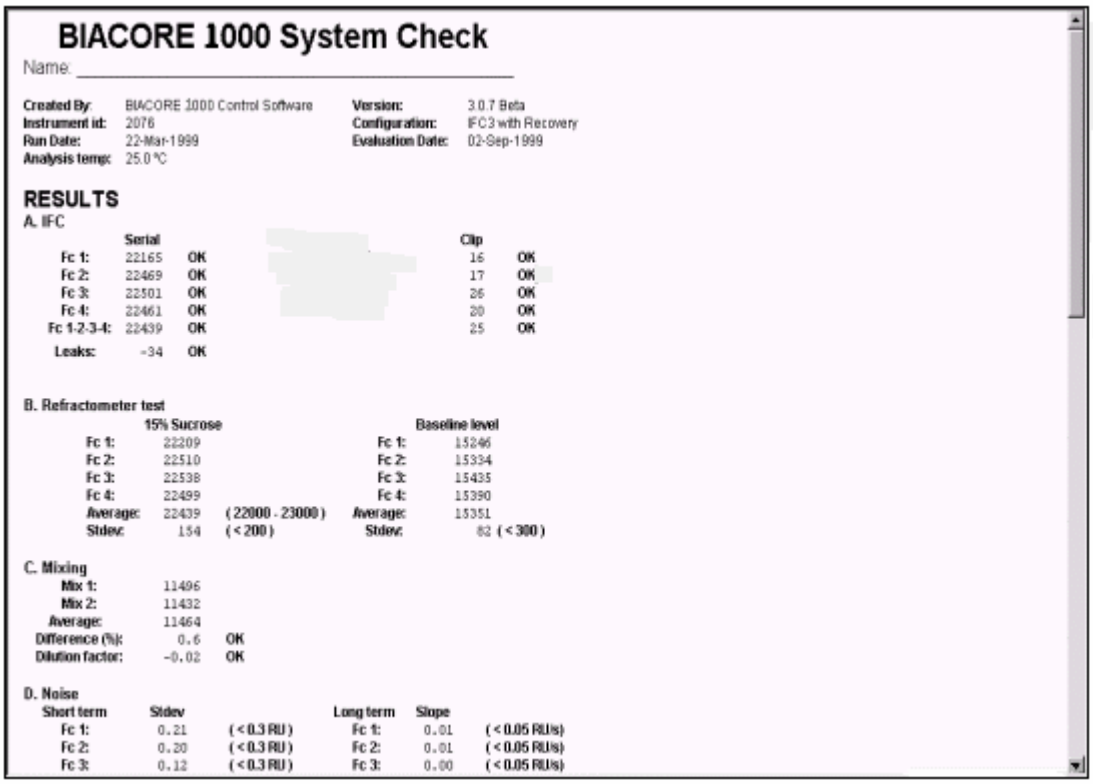


（システムの評価）
システムチェック終了後、以下のボックスが表示される。



↓

Evaluate をクリックすると、結果が次のようなシートとして表示される。



BIACORE 1000 System Check

Name: _____

Created By:	BIACORE 1000 Control Software	Version:	3.0.7 Beta
Instrument id:	2076	Configuration:	IFC3 with Recovery
Run Date:	22-Mar-1999	Evaluation Date:	02-Sep-1999
Analysis temp:	25.0 °C		

RESULTS

A. IFC

	Serial		Clip	
Fc 1:	22165	OK	16	OK
Fc 2:	22469	OK	17	OK
Fc 3:	22501	OK	26	OK
Fc 4:	22461	OK	20	OK
Fc 1-2-3-4:	22439	OK	25	OK
Leaks:	-34	OK		

B. Refractometer test

	15% Sucrose		Baseline level	
Fc 1:	22209		Fc 1:	15246
Fc 2:	22510		Fc 2:	15334
Fc 3:	22538		Fc 3:	15435
Fc 4:	22499		Fc 4:	15390
Average:	22439	(22000 - 23000)	Average:	15351
Stdev:	154	(< 200)	Stdev:	82 (< 300)

C. Mixing

Mix 1:	11496	
Mix 2:	11432	
Average:	11464	
Difference (%):	0.6	OK
Dilution factor:	-0.02	OK

D. Noise

Short term	Stdev		Long term	Slope	
Fc 1:	0.21	(< 0.3 RU)	Fc 1:	0.01	(< 0.05 RU/s)
Fc 2:	0.20	(< 0.3 RU)	Fc 2:	0.01	(< 0.05 RU/s)
Fc 3:	0.12	(< 0.3 RU)	Fc 3:	0.00	(< 0.05 RU/s)

エラーがある場合、該当する項目が赤色で表示される。
エラーがある場合には、画面の次ページの解説にしたがって対処する。それでもシステムの調子が思わしくない場合には、機械の故障が考えられる。

機器の信頼性のために、システムチェックはできるだけ定期的に実施すると良い。

7.データ管理

実験結果ファイルは各自のディレクトリー内に保存する。各自のディレクトリーは以下の方法で **Biauser** のディレクトリー中に作成する。

1）**Explore** から作成する方法

Start → **Program** → **Windows Explores** をクリックする。

↓

C：（ハードディスク）の中の **Biauser** のディレクトリーをハイライトにし、**File** → **New** → **Folder** をクリックする。

↓

フォルダー名を入力し、**Enter** をクリックする。

2）**My computer** から作成する方法

BIACORE control software をアイコン化し、初期画面を出す。

↓

My computer → **C：**をクリックし、**Biauser** のディレクトリーをハイライトにする。

↓

File → **New** → **Folder** をクリックし、フォルダー名入力後、**Enter** をクリックする。

フォルダーの作成における注意事項・解説

自分のフォルダーは **Biauser** の中に作成する。他のフォルダー内に作成すると（例えば Biacore 等）、ソフトウェアの再インストール時に、消去されてしまう場合がある。
各自のフォルダーの中に、さらに詳細なフォルダーを作成することも可能である。
日付あるいは実験内容など細かくフォルダーを作成すると便利である。

ファイルの容量について

基本的な実験での各ファイルの容量はおおよそ以下のようになる。

固定化操作	
アミンカップリングの場合	約 20 kb
相互作用の検討	
5 サンプルの場合	約 90 kb

8.プログラムの説明

ここでは、プログラムを基礎から理解することを目的として説明する。

Biacore のプログラムは基本的に 1 つの **MAIN ボックス**と 1 つあるいは複数個の **DEFINE APROG ボックス**から成り立っている。MAIN ボックスは、Method の諸条件を決め、DEFINE APROG ボックスで実際の実験操作を行う。どちらのボックスも最後の行に END を入力してボックスを括る。

ステップ 1： MAIN ボックス

1 つのプログラムには必ず 1 つだけの MAIN ボックスが存在する。プログラムは MAIN ボックスだけで動かすことができる。MAIN ボックスに入力したコマンドは、上から順番に実行される。
非常に簡単な MAIN ボックスのみのプログラムを示すと次のようになる。
File → **New Method** をクリックし、新しいMethodボックスを開き、コマンドを入力する。

```
MAIN
        FLOWCELL 1
END
```

Run → **Run Method...** をクリックすると、プログラムが実行する。モニター画面上の右下、 Status windowのFLOWCELLが 1 に設定されすぐにプログラムが終了する。

次に、MAIN ボックスのコマンドを以下のように増やす。
同様に Run させる。

```
MAIN
        FLOWCELL 1
        FLOWCELL 2
        FLOWCELL 3
        FLOWCELL 4
END
```

Run させると FLOWCELL 1 → 2 → 3 → 4 と切り替わり終了する。
このように、**MAIN ボックスはコマンドを上から順番に実行していく。**

（参考）
MAIN ボックスだけを使用し、便利な洗浄プログラムを組むことができる。プログラムで Working Tools 中のメンテナンスコマンドを実行することができる。

```
MAIN
        Prime
        Prime
        Rinse
        Rinse
END
```

上記のように入力後、Run させると、Prime を 2 回、Rinse を 2 回実行して終了する。

プログラム中に MAIN ボックスが 1 個あれば、プログラムは実行される。

ステップ 2： APROGボックス
プログラムは MAIN ボックスがあれば Run させることができるが、MAIN ボックスだけではサンプルの添加等の実験操作を行うことはできない。実験操作については **APROG**（Analysis Program の略）ボックスを使用すると実行することができる。

ここでは、サンプルを 1 回インジェクトするプログラムを作成してみる。
R2A1 にサンプルをセットし、このサンプルを 1 分間インジェクトするプログラムを作成する。

```
DEFINE   APROG   injection
        FLOW      5
        INJECT   R2A1   5
END
```

DEFINE APROG injection の **injection** とは、この APROG ボックスの名前になる。
FLOW は流速の設定で、5µl/min になる。
このプログラムを入力し、**Run** → **Prerun Method**を行うと以下のような“**error**”が表示される。（Prerun Methodは、作成したプログラム言語が正しいかどうか検索するものである。29 ページ参照）。

```
>> Expecting keyword MAIN
```

これは、MAIN ボックスがないというメッセージである。

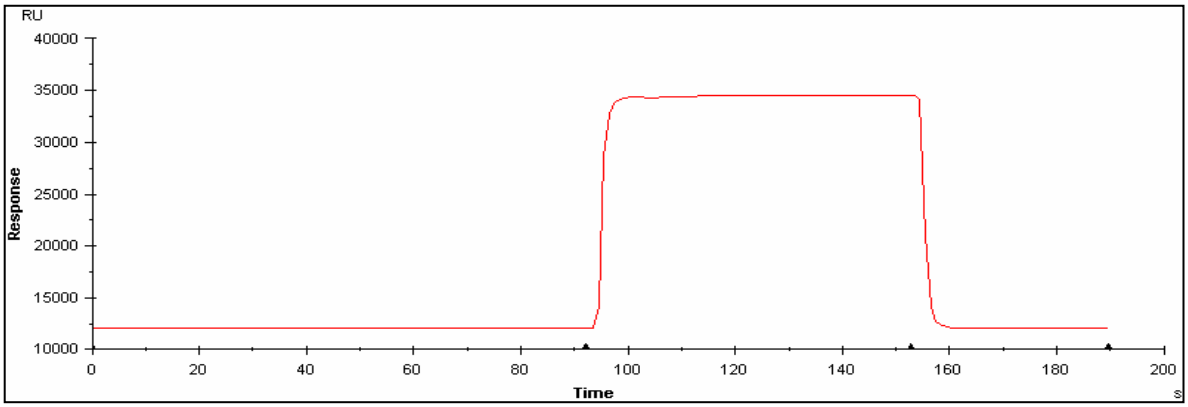
プログラムは APROG ボックスだけで実行することはできない。

実際には、MAIN ボックスで、APROG ボックスを実行するように指定する。

```
DEFINE    APROG    injection
          FLOW     5
          INJECT   R2A1   5
END

MAIN
          FLOWCELL    1
          APROG            injection
END
```

まず MAIN ボックスを順番に実行し、APROG injection で上記の DEFINE APROG injection が実行される。APROG ボックスが終了すると MAIN ボックスは END となりプログラムが終了する。



DEFINE　APROG（名前）と **MAIN** ボックスの **APROG**　（名前）の名前が一致していないとプログラムは実行されない。

同一の APROG ボックスを数回繰り返したい場合には、MAIN ボックスの APROG injection を繰り返し回数だけ入力する。
次の場合には APROG injection を 2 回繰り返す。

```
DEFINE    APROG injection
        FLOW       5
        INJECT    R2A1    5

END

MAIN
        FLOWCELL    1
        APROG           injection
        APROG           injection
END
```

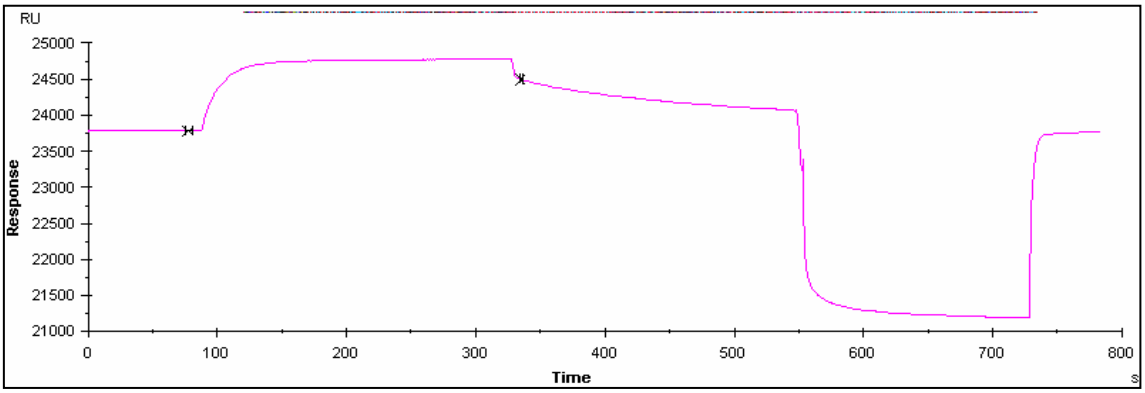
このプログラムを少し変更すると、APROG injection をフローセルを変えて実行することができる。

```
DEFINE    APROG    injection
        FLOW       5
        INJECT    R2A1    5
END

        MAIN
        FLOWCELL        1
        APROG           injection
        FLOWCELL        2
        APROG           injection
        FLOWCELL        3
        APROG           injection
        FLOWCELL        4
        APROG           injection
END
```

ステップ 3：　レポートポイント

レポートポイントをとることで、センサーグラムの任意の時間における測定値（RU）をセンサーグラムの下のレポートポイントテーブルに表示させることができる。（14 ページ参照）



APROG	FC	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
kinetics	4	78.0	5.0	23787.1	0.60	-0.16	Yes	0	baseline
kinetics	4	335.0	2.0	24500.6	5.39	-6.78	No	713.5	bound

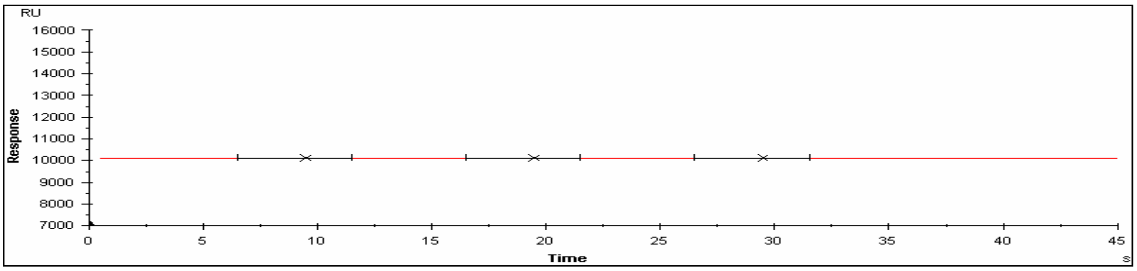
この表がレポートポイントテーブルである。
レポートポイントをとる操作をプログラムで行うことができる。

```
DEFINE    APROG Injection
          FLOW        5
  0:10    RPOINT      10sec
  0:20    RPOINT      20sec
  0:30    RPOINT      30sec
END

MAIN
          FLOWCELL    1
          APROG       injection
END
```

上記プログラムでは、センサーグラムをスタートさせると任意の時間で経時的にレポートポイントをとる。**APROG** ボックスで RPOINT の前の時間がレポートポイントをとる時間となる。**0:10　　RPOINT　　10sec** の場合には、センサーグラム測定開始から 10 秒後にレポートポイントをとることを表す。

プログラムを実行すると、次のようなセンサーグラムとレポートポイントテーブルが表示される。



Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
101.5	5.0	34306.6	108.27	37.67	No	#N/A	10sec
111.5	5.0	34437.7	28.41	14.95	No	#N/A	20sec
121.5	5.0	34503.2	5.24	2.78	No	#N/A	30sec

プログラム中の RPOINT の右側に入力したもの（例えば 10 sec、20sec、30sec）は Id になり、表中に表示される。レポートポイントテーブルの AbsResp はグラフの縦軸に相当する値（絶対値）、RelResp は設定したベースラインとの差（相対値）になる。レポートポイントは設定した時間を中心とした 5 秒間の平均値として計算される（Window 5）。

（アスタリスクマーク（＊）を使用した時間設定の仕方）

レポートポイントの時間をセンサーグラム開始からの時間の設定では紛らわしいので、コマンドの実行開始時間を基点とした設定にすることができる。

```
DEFINE    APROG assay
            FLOW          5
      *     INJECT        R1A1    5
   0:10     RPOINT        10sec
    0:20    RPOINT        20sec
    0:30    RPOINT        30sec
      *     INJECT        R1A1    5
    0:10    RPOINT        10sec
    0:20    RPOINT        20sec
    0:30    RPOINT        30sec
END
MAIN
  FOWCELL        1
  APROG          assay
END
```

このプログラムの

0:10　RPOINT　　10sec

は、その直前の

＊　INJECT　　R1A1　5

の＊印を基点とするので、R1A1 のサンプルのインジェクション開始時間から 10 秒後にレポートポイントを作成することになる。このプログラムでは、さらに 20 秒後、30 秒後にレポートポイントをとるようになっている。

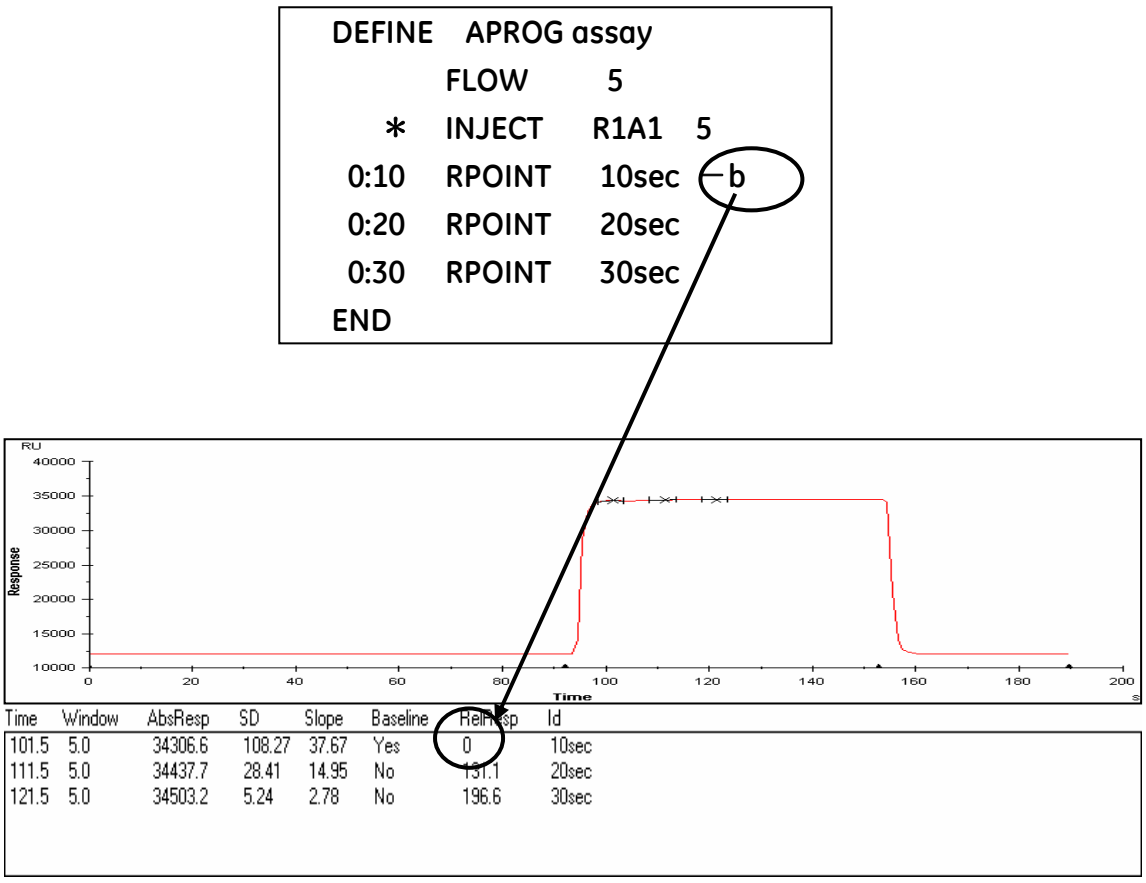
（ベースラインの取り方）

サンプルの結合量を表示させる場合には、インジェクトする前の値をベースライン（相対値 0）とし、結合量をベースラインとの相対値で表示させる。

次のように、プログラム中の RPOINT コマンドの後に－b と入力すると、

0:10　RPOINT　　10sec　　－b

その時点の値がベースライン（相対値 0）となり、それ以後の値がベースラインとの差（相対値）として表示される。



ステップ 4： 固定化のプログラム

C：＼biacore1000＼guide＼methods とディレクトリーを開け、固定化のプログラムである **amine.blm** をクリックし、ファイルを呼び出す。

```
DEFINE APROG immob
 CAPTION Amine coupling
              FLOW        10
              DILUTE      R2E1 R2E2 R2E3 50
  *           INJECT      R2E3   70
-0:10         RPOINT      Baseline -b
              INJECT      R2A1   70
              INJECT      R2E4   70
  *           INJECT      R2F3   10
 2:00         RPOINT      immob
END

MAIN
              RACK 1      thermo_b
              RACK 2      thermo_a
              FLOWCELL    1
              APROG       immob
              APPEND      CONTINUE
END
```

今までどおりMAINボックスを順番に実行する。**RACK 1 thermo_b** はラックベースの設定であるが、あらかじめ**Command → Rack Base** で設定している場合には、削除しても差し支えない。

APROG　ボックス

CAPTION

センサーグラムのタイトル。この場合には、タイトルが Amine coupling になる。センサーグラムのタイトルを入力することができる。

FLOW 10

流速を 10µl/min に設定する。

DILUTE　　R2E1 R2E2 R2E3 50

NHS と EDC の混合液を調製する。 **R2E1** に EDC 溶液を **R2E2** に NHS 溶液をセット（逆でも可）し、**R2E3** に混合するための空容器をセットする。50 は R2E1 のサンプルの混合割合であり、この場合 50%である。この混合液は全量 200µl 作製する。

INJECT　　R2E3　70

R2E3 で作成した混合液 70µl をインジェクトする。流速が 10µl/min なので 7 分間のコンタクトタイムになる（目的によりこの時間を変更する）。

INJECT　　R2A1　70

R2A1 にセットされたリガンドを 70µl インジェクトする（目的によりこの時間を変更する）。

INJECT　　R2E4　70

R2E4 にセットされたエタノールアミンを 70µl インジェクトする。
（通常は NHS 活性化時間と同じ時間にする）。

INJECT　　R2F3　10

洗浄溶液をインジェクトする（非特異的吸着を洗う。目的により省略することもできる）。　（例）50mM　NaOH　等

MAIN ボックス

FLOWCELL 1

検出モードをフローセル 1 にする。

APROG immob

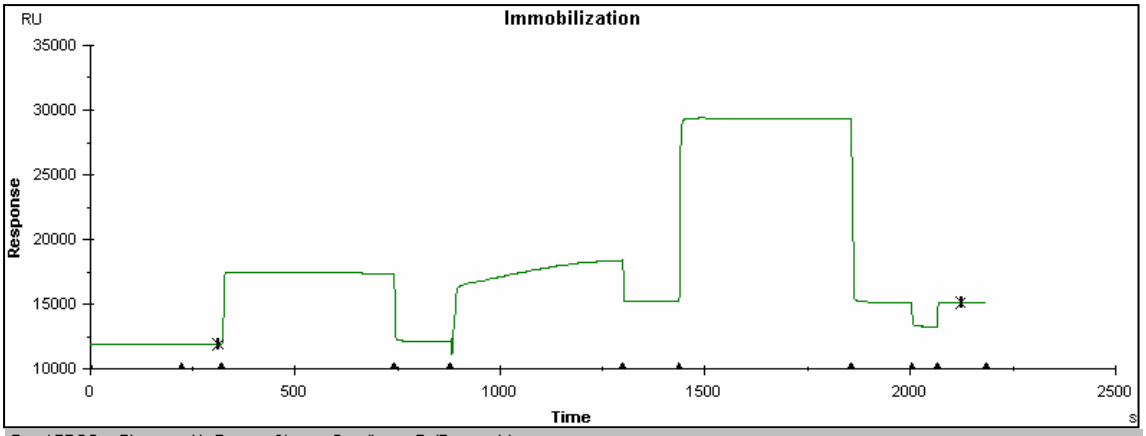
APROG immob ボックスを実行する。

APPEND CONTINUE

すべてのプログラムを終了したら、Continue 状態（すべてのフローセルに 5µl/min の流速でランニング緩衝液を流すコマンド。53 ページ参照）。

プログラム作成のときは、通常は最後に APPEND CONTINUE と入力する。

このプログラムを実行すると、通常以下のような結果が得られる。



Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id
2	immob	312.5	11956.0	0.02	Yes	0	Baseline
2	immob	2123.5	15120.2	0.23	No	3164.2	immob

ステップ 5： 相互作用のプログラム

相互作用のプログラムは基本的には固定化のプログラムと同様である。

ここでは、サンプルを 2 分間インジェクトするプログラムを作成してみる。
R2A1 に置いたサンプルをインジェクトするプログラム下に示す。

```
DEFINE APROG assay
    FLOW          20
    INJECT        R2A1   40
END
MAIN
    FLOWCELL      1
    APROG         assay
    APPEND        CONTINUE
END
```

このプログラムは、R2A1 という固定の位置にサンプルを 1 個置いた場合のプログラムであるが、通常の実験では、サンプルは複数個あり、サンプルのポジションが毎回変わることになる。
次に 3 つのサンプルを同じプログラムで測定するプログラムを作成してみる。
下のプログラムの場合、サンプルは R2A1、R2A2、R2A3 にある。

```
DEFINE APROG assay
PARAM     %pos
          FLOW          20
          INJECT        %pos    40
END

MAIN
          FLOWCELL            1
          APROG  assay        R2A1
          APROG  assay        R2A2
          APROG  assay        R2A3
          APPEND CONTINUE
END
```

Biacore のプログラムでは、パラメーターは"%"で表示する。この場合には、サンプルのポジションが毎回異なるので、**INJECT %pos** と入力する。パラメーターとして"%pos"を用いる場合には、**PARAM** の後に**%pos** と入力する。**MAIN ボックス**に APROG assay があるので **APROG assay** が実行されるが、**APROG assay R2A1** と入力すると、**R2A1** がサンプル位置（**%POS**）になり、2 回目は **R2A2**、3 回目は **R2A3** がサンプル位置になる。このようなプログラムを作成すると、サンプル位置が異なる分析を行うことができる。さらにサンプル数を増やしたい場合には、**APROG assay サンプル位置**をコピー/ペーストして増やし、ポジションを変更していく。

通常、アナライト結合後、再生溶液で再生を行うので、以下のようなプログラムになる。

```
DEFINE APROG assay
 PARAM    %pos
          FLOW          20
   *      INJECT        %pos   40
 -0:10    RPOINT        baseline –b
  2:20    RPOINT        bound
   *      INJECT        R2F3    20
  2:00    RPOINT        regeneration
END

 MAIN
          FLOWCELL      1
          APROG         assay  R2A1
          APROG         assay  R2A2
          APROG         assay  R2A3
          APPEND         CONTINUE
 END
```

（変数が 2 つ以上ある場合のプログラムの作成）

プログラムの中に変数（毎回変化するもの）が 2 つ以上ある場合でも基本的に同じ方法をとる。例えば、サンプルのポジションとインジェクト容量の 2 個のパラメーターが毎回変化する場合のプログラムは以下のようになる。
サンプルは R2A1、R2A2、R2A3 の 3 つのサンプルで、それぞれを 10µl、20µl、30µl と異なった量をインジェクトするとする。

```
DEFINE APROG assay
PARAM     %pos %vol
          FLOW          20
   *      INJECT        %pos %vol
-0:10     RPOINT        baseline –b
 2:20     RPOINT        bound
   *      INJECT        R2F3   20
 2:00     RPOINT        regeneration
END

MAIN
          FLOWCELL      1
          APROG         assay    R2A1   10
          APROG         assay    R2A2   20
          APROG         assay    R2A3   30
          APPEND        CONTINUE
END
```

この場合には変数が**% pos** と**% vol** の 2 個になる。
PARAM　%pos　%vol　となり、**INJECT　%pos　%vol** と入力する。
さらに、**MAIN ボックス**中の **APROG assay** の後に **PARAM　%pos　%vol** の順番でそれぞれを入力する。
つまり、1 回目は、R2A1 のポジションで 10µl（ APROG assay　**R2A1　10**）
　　2 回目は、R2A2 のポジションで 20µl（ APROG assay　**R2A2　20**）
　　3 回目は、R2A3 のポジションで 30µl（ APROG assay　**R2A3　30**）
と入力する。

APROG の後は **PRAM** で設定した変数内容の順番で入力する。

（相互作用の検出のための基本的なプログラム）

実際に相互作用を分析する上で有効なプログラムを作成してみる。
実験のモデルとして以下の条件を用いる。

	（サンプル）	
フローセル 1：コントロールセル	①Antigen_1	25μg/ml
フローセル 2：抗体固定化フローセル	②Antigen_1	12.5μg/ml
アナライト　：抗原（2 種類、2 濃度）	③Antigen_2	25μg/ml
	④Antigen_2	12.5μg/ml

```
DEFINE APROG   assay
PARAM    %pos   %ID   %conc
  CAPTION   Binding of %ID（%conc）  to immobilized antibody
            FLOW            20
   *        KINJECT         %pos   60    180
-0:10       RPOINT          Baseline    -b
 3:20       RPOINT          bound
   *        INJECT          R2F3    20
 2:00       RPOINT          regeneration
END

MAIN
            FLOWCELL   1
            APROG       assay    R2A1   antigen_1    25ug/ml
            APROG       assay    R2A2   antigen_1    12.5ug/ml
            APROG       assay    R2A3   antigen_2    25ug/ml
            APROG       assay    R2A4   antigen_2    12.5ug/ml
            FLOWCELL   2
            APROG       assay    R2A1   antigen_1    25ug/ml
            APROG       assay    R2A2   antigen_1    12.5ug/ml
            APROG       assay    R2A3   antigen_2    25ug/ml
            APROG       assay    R2A4   antigen_2    12.5ug/ml
            APPEND   CONTINUE
END
```

この条件では変数となるのは、サンプル位置のみであるが、%ID（サンプルの種類）および%conc（サンプル濃度）を変数として入力することで、各サンプルポジションにおけるサンプル名および濃度を具体的に入力することで、記録として利用することができる。**CAPTION　Binding of %ID（%conc）　to immobilized antibody** を記載しておくと、センサーグラムのタイトルに%ID と%conc がそのまま代入さる。1 つめのサンプルでは、タイトルが

“Binding　of　Antigen_1（25ug/ml) to immobilized antibody”

となり、2 つめのサンプルでは、

“Binding　of　Antigen_1（12.5 ug/ml）　to immobilized antibody”

となって、センサーグラムグラフのタイトルを見るだけでどのようなサンプルを使用したか簡単にわかるので非常に便利である。通常は、このプログラムを使用して測定を行うとよい（必要があればインジェクト容量などを変更する)。

また、タイトル表示やサンプルの記載等を必要としない場合には、下のような簡単なプログラムを作成して実験を行ってもよい。

```
DEFINE APROG assay
 PARAM     %pos
          FLOW          20
   *      INJECT        %pos   40
 -0:10    RPOINT        baseline –b
  2:20    RPOINT        bound
   *      INJECT        R2F3   20
  2:00    RPOINT        regeneration
MAIN
          FLOWCELL      1
          APROG         assay     R2A1
          APROG         assay     R2A2
          APROG         assay     R2A3
          FLOWCELL      2
          APROG         assay     R2A1
          APROG         assay     R2A2
          APROG         assay     R2A3
          APROG         assay     R2A4
          APPEND        CONTINUE
END
```

索　引

[あ]
アスタリスクマーク …… 67
アナライト …… 40
アミンカップリング …… 18,19,24
アミンカップリングキット …… 19
アルデヒドカップリング …… 18

インジェクト …… 11,43
インジェクトの拡張機能 …… 47
インジェクトの中止 …… 46

エアの除去 …… 56
エクストラクリーンアップ …… 47

温度設定 …… 9

[か]
核酸の固定化 …… 19
カップリング緩衝液 …… 20

基本操作 …… 11
緊急停止 …… 31

固定化プログラム …… 25,74
固定化量の調節 …… 35
コントロールウエアソフトの起動 …… 2

[さ]
再生溶液 …… 41,45
サニタイズ …… 56
サンプルの調整 …… 20,46
サンプルの回収 …… 47
システムチェック …… 58
システムの初期化 …… 3

シャットダウン …… 53

センサーチップ …… 4
センサーチップの挿入 …… 3
センサーチップの抜き取り …… 54
センサーチップの保存 …… 54

相互作用の検討（マニュアル操作） …… 42
相互作用の検討（プログラム操作） …… 49
相互作用のプログラム …… 50,72
装置の配置 …… 1
ソフトウエアの起動 …… 2

[た]
チオールカップリング …… 18

低分子物質の固定化 …… 20
データの管理 …… 61
電源の立ち上げ …… 1

[な]
ノーマライズ …… 10

[は]
パイオニアセンサーチップ …… 4

ファイルの保存 …… 17
ファイルの保存様式 …… 52
プライム …… 5,55
フラッシュ …… 55
プレコンセントレーション …… 21
プレラン …… 29
プログラムの実行 …… 30
プログラムの終了 …… 32
プログラムの説明 …… 62
プログラムによる相互作用の検討 …… 49

ベースラインの取り方 15,68
ペプチドの固定化 20

[ま]
マニュアルインジェクト 35
メインボックス 62
メソッドの編集 28
メンテナンス 55

[ら]
ラックベース 7,8

リガンド 18
リガンド希釈液 20
リガンドチオールカップリング 18
リガンドの固定化 18,24
リファレンスライン 14
リンス 55

レポートポイント 14,66

流路の詰まりのある時 57

INDEX

[A]

Aprog ボックス 63

[B]

BIGINJECT 43

B1 チップ 4

[C]

CM5 チップ 4

COINJECT 43

CONTINUE 53

Command Queue 48

C1 チップ 4

[D]

Desorb 55

DNA の固定化 19

Dock 3

[E]

Extra Cleanup 47

[F]

F1 チップ 4

FLOWCELL 11

FLUSH 55

[H]

HPA チップ 4

[I]

INJECT 11,43,47

[K]

KINJECT 43

[L]

L1 チップ 4

[M]

Main ボックス 25,50,62

Method の編集 28

[N]

Normalize 10

NTA チップ 4

[P]

Prerun Method 29

PRIME 5,55

[Q]

QUICKINJECT 43

[R]

Rinse 55

[S]

SA チップ 4

Sanitize 56

[U]

Unclogging 57

Undock 54

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告　誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意　誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁止　⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁止

電源コード・電源プラグを傷つけない

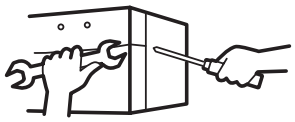
●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

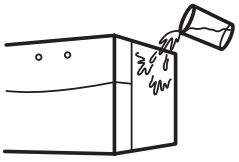
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

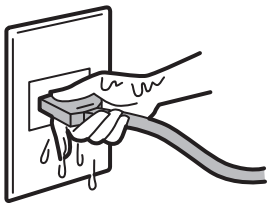
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

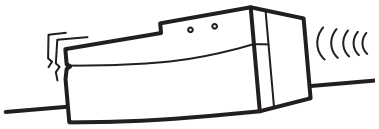
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

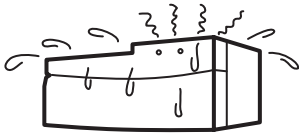
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

©2009 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店